

مقایسه روش‌های FTIR و تحلیل توالی ژن 16S rDNA در شناسایی و رده‌بندی باکتری‌های متیلوتروف

اسحاق زمانی، مجید بوذری* و گیتی امتیازی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

تحلیل توالی 16S rDNA اگر چه روشی نسبتاً دقیق و قابل اعتماد برای شناسایی و تاکسونومی باکتری‌هاست اما فرآیندی وقت‌گیر و پُر هزینه است. به همین دلیل یافتن راه‌های جایگزین همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. یکی از روش‌های مطرح FTIR (Fourier Transform Infrared) است که روشی فیزیکی-شیمیایی است مبتنی بر اندازه‌گیری لرزش پیوندهای مولکولی یک ترکیب که به وسیله فرکانس مناسبی از پرتو مادون قرمز تحریک شده‌اند. در این پژوهش که به منظور بررسی کارایی روش FTIR در شناسایی و تاکسونومی باکتری‌ها و مقایسه آن با روش تحلیل توالی 16S rDNA بر روی باکتری‌های متیلوتروف (مهم‌ترین گروه تجزیه‌کننده مشتقات کلردار متان) صورت گرفت، از ۳۰ باکتری جداسازی شده هفت باکتری انتخاب و ابتدا از طریق تکثیر قسمتی از ژن 16S rDNA و توالی‌یابی آن شناسایی شدند و با نرم‌افزار MEGA5 درخت فیلوژنیک آنها ترسیم گردید. همچنین، با روش FTIR طیف عبور این باکتری‌ها در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ به دست آمد. داده‌های حاصل از این روش با نرم‌افزار SPSS تحلیل شد که دندروگرام حاصل از آن شباهت زیادی (بیش از ۸۰ درصد) به دندروگرام به دست آمده از بررسی توالی 16S rDNA داشت. نتایج نشان داد که FTIR روشی خوبی برای تمایز باکتری‌ها از یکدیگر است اما هنوز نمی‌تواند به تنهایی برای تاکسونومی استفاده شود و اگر بانک اطلاعاتی مناسبی برای داده‌های FTIR ارایه شود این روش می‌تواند به عنوان رقیبی برای تحلیل توالی 16S rDNA مطرح گردد.

واژه‌های کلیدی: تاکسونومی، متیلوتروف، 16S rDNA، FTIR

مقدمه

استفاده کنند. این باکتری‌ها که از نظر مورفولوژی تنوع زیادی دارند، اغلب هوازی هستند و به صورت گسترده در محیط‌های آبی و خاک یافت می‌شوند. جنس‌های گوناگونی از باکتری‌ها در این گروه قرار دارند از جمله: *Methylobacterium*، *Hyphomicrobium*

متیلوتروف‌ها که گروهی از باکتری‌های کم‌وارگان‌تروف هستند قادرند از ترکیبات آلی یک کربنه مانند متان، متانول، متیل آمین، فرمات، کلرومتان و ترکیباتی نظیر آنها به عنوان منبع کربن و انرژی

عبور پرتو از میان یک نمونه طول موج های خاصی جذب شده، باعث لرزش هایی مانند کشیدگی، جمع شدگی و خمیدگی پیوندهای شیمیایی در ماده می شوند. گروه های عملکردی موجود در مولکول (نظیر OH، SH و NH) نقش مهمی در این فرآیند دارند. طیف های FTIR باکتری ها می توانند برای ارزیابی ترکیب کلی ساختار آنها از جمله پروتئین ها، اسیدهای چرب، کربوهیدرات ها، نوکلئیک اسیدها و لیپو پلی ساکاریدها استفاده شوند (Duygu *et al.*, 2009؛ Davis and Mauer, 2010).

با توجه به نقش مهمی که باکتری های متیلوتروف از نظر پاکسازی آلاینده های محیطی دارند و اهمیت مطالعه آنها و به منظور بررسی کارآیی روش FTIR در شناسایی و تاکسونومی این باکتری ها و مقایسه آن با روش تحلیل توالی 16S rDNA این پژوهش انجام شد.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری های متیلوتروف

برای غنی سازی اولیه این باکتری ها، از محیط کشت معدنی پایه حاوی ۰/۵ درصد متانول استفاده شد. اجزای سازنده این محیط شامل فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۱/۳۶ گرم، سولفات منیزیم ۰/۳ گرم، سولفات آمونیوم ۰/۵ گرم، دی سدیم هیدروژن فسفات ۲/۱۳ گرم و کلرید کلسیم ۱/۹۹ میلی گرم، سولفات آهن ۱ میلی گرم، سولفات منگنز ۰/۳۵ میلی گرم، مولبیدات سدیم ۰/۵ میلی گرم و ویتامین B₁₂ (در صورت نیاز) به میزان ۲/۵ میکروگرم بودند. این اجزا در یک لیتر آب مقطر حل شده و اسیدیته آن بر روی ۷/۲ تنظیم گردید. پس از استریل کردن محیط کشت و خنک شدن آن

Methylomonas، *Methylomicrobium* و

Pseudomonas (Trotsenko and Doronina, 2003). مشتقات کلردار متان ترکیبات شیمیایی پر مصرفی هستند که در ساخت خنک کننده ها کاربرد زیادی دارند و در صنعت نیز به عنوان حلال استفاده می شوند. این ترکیبات پایداری بالایی دارند، به مقادیر مختلفی در آب قابل حل هستند، در تخریب لایه ازون نقش دارند و برخی نیز مانند CH₂Cl₂ آثار سمی داشته و خاصیت کارسینوژنیک آنها در موجودات زنده مشخص شده است. بنابراین، آلاینده های محیطی مهمی هستند که مهم ترین راه حذف آنها از محیط، تجزیه زیستی است و باکتری های متیلوتروف مهم ترین گروه زیستی مصرف کننده این ترکیبات شناخته شده اند. لذا، کشت، جداسازی، شناسایی و مطالعه این باکتری ها از اهمیت خاصی برخوردار است (Leisinger and Braus-Stromeier, 1995).

امروزه از روش های گوناگون از جمله روش های مولکولی مانند تحلیل توالی 16S rDNA در شناسایی و تاکسونومی باکتری ها استفاده می شود که گرچه روش نسبتاً دقیقی است اما فرآیندی وقت گیر و پرهزینه است. از این رو، پژوهشگران به دنبال روش های ساده تر و سریع تر برای جایگزینی آن بوده اند. روش FTIR (Fourier Transform Infrared) که سابقه استفاده از آن در میکروبیولوژی به دهه ۱۹۵۰ بر می گردد، به تازگی به عنوان روشی مناسب برای مقایسه و شناسایی سریع باکتری ها مطرح شده است (Salman *et al.*, 2010 و Ammann and Brandl, 2011). این روش، فیزیکو-شیمیایی بوده، مبتنی بر اندازه گیری لرزش پیوندهای مولکولی ترکیبی است که به وسیله فرکانس مناسبی از پرتو مادون قرمز تحریک شده باشد. در حین

با اضافه کردن NaCl و CTAB اجزای لیز شده سلولی رسوب کرده، با محلول فنل کلروفرم ایزوآمیل الکل از فاز آبی حاوی DNA جداسازی شد. در پایان، DNA توسط ایزوپروپانول رسوب داده شد و پس از شستشو با اتانول در بافر TE به صورت سوسپانسیون در آمد (Ivanova et al., 2000؛ Balachandar et al., 2008).

برای تکثیر بخشی از ژن 16S rDNA از دو پرایمر برای تکثیر بخشی از ژن 16S rDNA (3'-AGGAGGTGATCCAACCGC-5') و DG74 (3'-AACTGGAGGAAGGTGGGG-5') (RW01) (TAG Copenhagen, Denmark) استفاده شد که قطعه ای در حدود ۳۷۰ جفت باز از این ژن را تکثیر می کند. مخلوط واکنش PCR در هر ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲ میکرولیتر (۱۰ میکرومولار) از هر کدام از پرایمرها، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ میلی مولار) dNTPs، ۰/۷ میکرولیتر (۵۰ میلی مولار) کلرید منیزیم، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲۵ میکرولیتر (۰/۲۵ واحد) Taq DNA pol (شرکت سیناژن ایران) و ۱۷/۰۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل بود. PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام گرفت. برنامه شامل واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ دور با ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و یک مرحله نهایی سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود (Marchesi et al., 1998؛ Balachandar et al., 2008).

تعیین توالی محصول PCR ژن 16S rDNA، شناسایی باکتری ها و ترسیم درخت فیلوژنیک

پس از تکثیر قطعه ۳۷۰ جفت باز از ژن 16S rDNA با روش PCR و بررسی تک باندها و

مقدار ۰/۵ درصد متانول به عنوان منبع کربن به آن اضافه، سپس ۲۰ نمونه مختلف از آب و پساب (متعلق به محدوده شهر اصفهان) و صافی های دستگاه تصفیه آب آشامیدنی خانگی به محیط ها تلقیح شد. پس از گذشت حدود یک هفته، ایجاد کدورت در محیط به عنوان نشانه رشد باکتری ها در نظر گرفته شد و پس از آن برای جداسازی و خالص سازی باکتری ها از محیط کشت مورد اشاره که حاوی ۱/۵ درصد آگار بود استفاده شد (Ivanova et al., 2000).

شناسایی باکتری با استفاده از توالی 16S rDNA

پس از جداسازی باکتری ها، برای تکثیر ژن 16S rDNA با روش PCR و تعیین توالی آن ژنوم باکتری ها استخراج گردید، از روش جوشاندن برای این کار استفاده شد و برای نوعی از باکتری ها که دارای رنگدانه بودند از روش CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) استفاده شد. در روش جوشاندن چند کلونی از باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل در یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری به صورت سوسپانسیون در آورده شد سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش جوشانده شد و پس از خنک شدن به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰ سانتیفریژ گردید. سپس، مایع رویی که حاوی DNA است به درون یک میکروتیوپ استریل جدید منتقل شد (Ntsaluba et al., 2011). در روش CTAB کشت مایع باکتری که در فاز لگاریتمی است سانتریفیوژ شده، سلول ها در بافر TE (Tris-HCl) ۱۰ میلی مولار + EDTA ۱ میلی مولار، اسیدیته (A= سوسپانسیون گردید و پس از افزودن لیزوزیم، پروتئیناز SDS، K و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد لیز شده، سوسپانسیون به صورت شفاف و چسبناک در آمد آنگاه

شناسایی باکتری با روش FTIR

آماده‌سازی نمونه‌های باکتری: ابتدا باکتری‌ها

روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. پس از رشد باکتری‌ها، کلونی آنها با آب مقطر استریل از سطح محیط کشت شستشو و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. آنگاه محلول رویی خارج و سلول‌ها دست کم سه مرتبه دیگر با آب مقطر استریل شستشو شدند. پس از آخرین شستشو، با خارج نمودن کامل مایع رویی درب میکروتیوب‌ها باز گذاشته شد و به مدت یک شب در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد درون آون قرار داده شدند تا آب آنها تبخیر و کاملاً خشک شود (Davis and Mauer, 2010; Zhao *et al.*, 2006).

تهیه نمونه برای FTIR: مقدار اندکی از جسم

سلولی خشک شده هر باکتری با مقدار مساوی از پتاسیم بروماید (KBr) در هاون مخصوصی مخلوط و به صورت پودر در آورده شد. این پودر بر روی دیسک کریستالی کوچکی قرار داده شد و دیسک به کمک جک مخصوصی تحت فشار قرار گرفت تا پودر بر روی آن تثبیت گردد (Davis; Zhao *et al.*, 2006; and Mauer, 2010).

طیف‌سنجی FTIR، مقایسه باکتری‌ها و رسم

درخت فیلوژنی: پس از آماده‌سازی نمونه، دیسک به دستگاه (JASCO, Spectroscop, FT/IR-6300 Japan) منتقل شد و طیف حاصل از سنجش مقدار عبور در محدوده عدد موج ۴۰۰-۴۰۰۰ بر سانتی‌متر^{-۱} (cm^{-۱}) به دست آمد. اطلاعات به دست آمده از طیف‌سنجی با نرم‌افزار Spektwin32 نسخه ۱/۷۱/۶/۱ (Friedrich Menges, Germany) بررسی و پردازش شد و نتایج آن برای رسم درخت فیلوژنی با نرم‌افزار

عدم آلودگی آن به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز، محصول به سفارش شرکت تکاپو زیست با روش Sanger در شرکت Bioneer کشور کره تعیین توالی گردید. توالی‌های به دست آمده با هر یک از پرایمرها با نرم‌افزار BioEdit نسخه ۷/۱/۷ با یکدیگر هم‌تراز (align) شدند. سپس، با بررسی کروماتوگرام‌های هر یک از این توالی‌ها با نرم‌افزار Chromas Pro نسخه ۱/۷/۴ و اعمال موارد لازم، توالی‌هایی با طول حدود ۳۷۰ نوکلئوتید به دست آمد. در این حالت چون هر نوکلئوتید طی فرآیند توالی‌یابی دو بار خوانده می‌شود، خطای احتمالی به ویژه در ابتدا و انتهای توالی با نرم‌افزارهای اشاره شده قابل اصلاح است. برای شناسایی باکتری‌ها توالی‌های به دست آمده برای هر یک از آنها در پایگاه داده‌های NCBI، توالی‌یابی گردید و با توجه به میزان تشابه و تطابق این توالی‌ها با توالی‌های مرجع (reference sequences) موجود در این پایگاه داده‌ها شناسایی باکتری‌ها انجام شد. علاوه بر این، برای بررسی تاکسونومی این باکتری‌ها و برای ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از توالی 16S rDNA، تعدادی از توالی‌های نزدیک به هر یک از باکتری‌های مورد نظر نیز از NCBI استخراج گردید. از نرم‌افزار MEGA5 برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. پس از وارد کردن توالی‌ها و هم‌تراز کردن آنها، از روش تحلیل The average-linkage-between-groups method که اغلب به UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) شناخته می‌شود، استفاده شد و با این روش الگوریتمی و با بوت استرپ ۵۰۰ درخت فیلوژنی ترسیم شد (Lin *et al.*; Oberreuter *et al.*, 2002; *al.*, 2007).

طیف‌های smooth نشده و normalize کردن آنها مشتق دوم طیف‌ها به دست آمد تا بدین وسیله نواحی و عدد موج‌های حفاظت شده و معنی‌داری که نشان‌دهنده وجود اختلاف بین طیف‌های باکتری‌های مختلف هستند، مشخص شوند. پس از مشخص کردن این عدد موج‌ها میزان عبور (transmittance) در باکتری‌های مختلف تعیین گردید. در مجموع، از ناحیه ۷۰۰ تا ۱۷۰۰ و ۲۸۰۰ تا ۳۰۰۰ حدود ۱۸ عدد موج مشخص برای این منظور در نظر گرفته شد (Holt et al., 1995؛ Lin et al., 2004؛ Davis and Mauer, 2010).

آنگاه میزان عبور برای هر یک از باکتری‌ها در عدد موج‌های مورد نظر مشخص و اطلاعات به دست آمده شامل دو شاخص عدد موج و میزان عبور در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ وارد شد. برای تحلیل داده‌ها و گروه‌بندی باکتری‌ها با استفاده از داده‌های ذکر شده، از تحلیل خوشه‌ای (Hierarchical HCA) (Cluster Analysis) با به کارگیری روش UPGMA (Between-groups Linkage) و فاصله مربع اقلیدسی (squared euclidian distance) استفاده شد. دومین روش استفاده شده برای تحلیل داده‌ها، روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی (یا PCA) (Principal Component Analysis) بود که روشی رایج برای تشخیص الگو است و به طور گسترده برای تفسیر واریانس در داده‌های طیفی استفاده می‌شود (Holt et al., 1995؛ Lin et al., 2004؛ Davis and Mauer, 2010).

نتایج

در این مطالعه، ابتدا تعداد ۳۰ باکتری از نمونه‌های مختلف آب، پساب و صافی‌های تصفیه آب آشامیدنی خانگی جداسازی شدند که با توجه به نتایج حاصل از

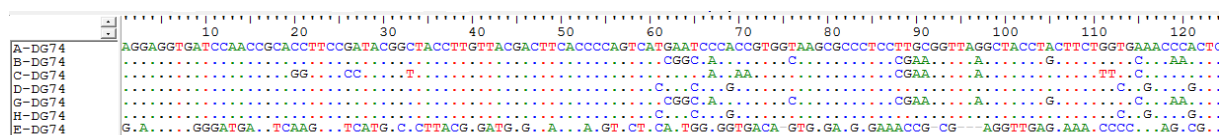
SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد (Rodriguez-Saona et al., 2004؛ Davis and Mauer, 2010؛ Ammann and Brandl, 2011).

در بررسی طیف مادون قرمز (IR) بر روی باکتری‌ها به طور مشخص پنج ناحیه برای شناسایی باکتری‌ها بایستی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار بگیرد. نخستین ناحیه طیف $3000-2800 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به اسیدهای چرب است. طیف $1700-1500 \text{ cm}^{-1}$ که ناحیه دوم را تشکیل می‌دهد شامل پیوندهای آمیدی I و II پروتئین‌ها و پپتیدهاست. ناحیه سوم که طیف $1500-1200 \text{ cm}^{-1}$ را در بر می‌گیرد ناحیه مخلوطی شامل لرزش‌های خمیدگی اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و ترکیبات حاوی فسفات است. ناحیه چهارم که در بر دارنده باندهای جذبی کربوهیدرات‌ها در دیواره سلولی باکتری‌هاست $1200-900 \text{ cm}^{-1}$ را شامل می‌شود و ناحیه پنجم $900-700 \text{ cm}^{-1}$ که ناحیه معروف به اثر انگشت است و شامل باندهای جذبی ضعیف اما کاملاً منحصر به فرد است و برای هر باکتری اختصاصیت بالایی را دارد (Davis and Mauer, 2010).

در یک نگاه کلی به طیف‌های باکتری‌ها، تمام آنها شبیه به هم دیده می‌شوند و شاید نتوان اختلاف زیادی بین آنها دید اما مشتق آنها تفاوت‌های معنی‌داری را در طیف‌ها مشخص تر می‌کند و از آن می‌توان برای ارزیابی شباهت‌ها و تفاوت‌ها در باکتری‌ها استفاده کرد. برای به دست آوردن عدد موج‌های مناسب جهت تفکیک و تمایز باکتری‌ها از یکدیگر علاوه بر استفاده از عدد موج‌های ذکر شده در منابع، از نرم‌افزار Spekwin32 نیز استفاده شد. پس از باز کردن فایل طیف‌های مربوط به تمام باکتری‌ها به صورت همپوشان در محیط نرم افزار و smoothing آنها و سپس حذف

که احتمالاً این باکتری از باکتری‌های دیگر متمایز است. با توجه به نتایج حاصل از توالی‌یابی باکتری‌ها در NCBI مواردی که دارای کمترین ارزش مورد انتظار (= صفر)، بیشترین درصد تشابه و بالاترین امتیاز برای هر یک از توالی‌ها بودند به عنوان ملاکی برای شناسایی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

برای بررسی روابط تاکسونومیک باکتری‌ها ابتدا دندروگرامی با استفاده از توالی‌های هفت باکتری مورد مطالعه ترسیم شد (شکل ۲). همان‌طور که در این دندروگرام مشاهده می‌شود باکتری‌های D و H در کنار یکدیگر و در یک خوشه قرار گرفته‌اند و نزدیک‌ترین شاخه به آن شاخه‌ای است که باکتری A بر روی آن قرار گرفته است و این سه باکتری به همراه هم خوشه‌ای را تشکیل می‌دهند که از خوشه دیگری که باکتری‌های B و G را بر روی خود جا داده است، جدا شده‌اند. باکتری C در شاخه‌ای جداگانه از خوشه در برگیرنده باکتری‌های A، D و H و B و G قرار دارد. باکتری E در شاخه جداگانه‌ای از تمام باکتری‌های دیگر جدا شده است.



شکل ۱- قسمتی از نتیجه هم‌تراز کردن توالی‌های 16S rDNA باکتری‌ها در نرم‌افزار BioEdit

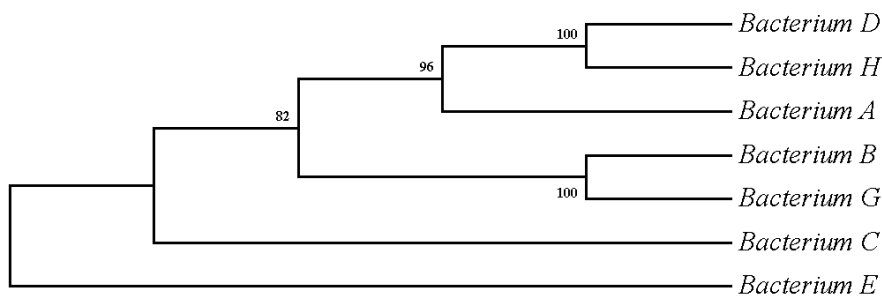
جدول ۱- نتایج BLAST توالی‌های هر یک از باکتری‌ها در NCBI. مقدار همپوشانی توالی مورد نظر (query coverage) برای تمام جدایه‌ها ۹۹ درصد و ارزش مورد انتظار (E-value) برابر با صفر بود.

جدایه	نام گونه	بیشترین امتیاز	بیشترین شباهت
A	<i>Methylobacillus flagellatus</i>	۶۶۴	۹۹ درصد
B	<i>Xantomonas campestris</i>	۶۷۱	۹۹ درصد
C	<i>Klebsiella oxytoca</i>	۶۸۶	۱۰۰ درصد
D	<i>Delftia acidivorans</i>	۶۷۵	۹۹ درصد
E	<i>Methylobacterium populi</i>	۶۶۰	۹۹ درصد
G	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	۶۷۱	۹۹ درصد
H	<i>Delftia acidivorans</i>	۶۷۵	۹۹ درصد

رنگ آمیزی و بررسی مورفولوژی زیر میکروسکوپ و همچنین ویژگی‌های ظاهری کلونی‌ها از میان آنها هفت باکتری برای ادامه کار انتخاب و به ترتیب A، B، C، D، E، G و H نامیده شدند.

از بین این هفت باکتری یکی از آنها یعنی A متیلوتروف اجباری بود که تنها بر روی محیط کشت حاوی متانول رشد کرده، کلونی‌های بی‌رنگ تا قهوه‌ای کم‌رنگ تشکیل داد. باکتری E هم یک باکتری گرم منفی با کلونی‌های صورتی تا نارنجی‌رنگ و مانند سایر باکتری‌ها متیلوتروف اختیاری بود. باکتری B دارای کلونی‌های زرد رنگی بود و کمترین میزان رشد متیلوتروفي را داشت. باکتری C نیز که دارای کلونی‌های سفید رنگ و شفاف بود رشد متیلوتروفي نسبتاً خوبی داشت. باکتری‌های D و H نیز شبیه هم بودند و کلونی‌های ریز و شیری رنگ داشتند. باکتری G نیز کلونی‌های زرد کم‌رنگی را تشکیل داد و رشد متیلوتروفي خوبی داشت.

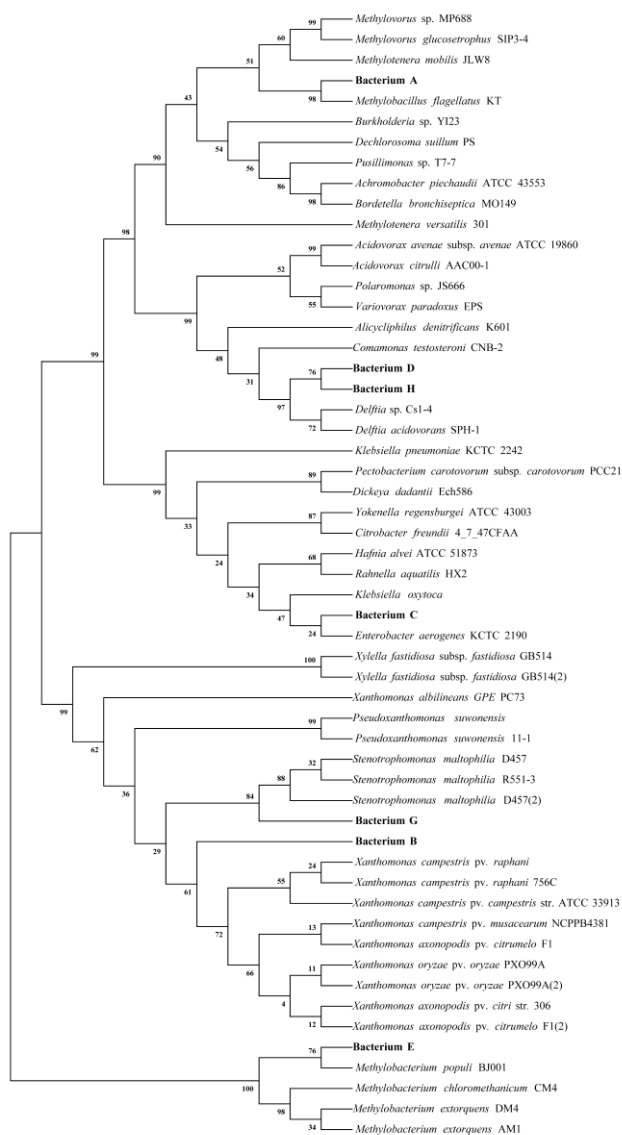
در هم‌تراز کردن توالی‌ها در نرم‌افزار BioEdit، اختلاف کلی بین توالی مربوط به باکتری E با سایر باکتری‌ها مشاهده گردید (شکل ۱) و این بدان معنی است



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از توالی 16S rDNA با روش UPGMA برای هفت باکتری متیلوتروف جداسازی شده

استخراج شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج به دست آمده دندروگرامی است که در شکل ۳ قابل مشاهده است.

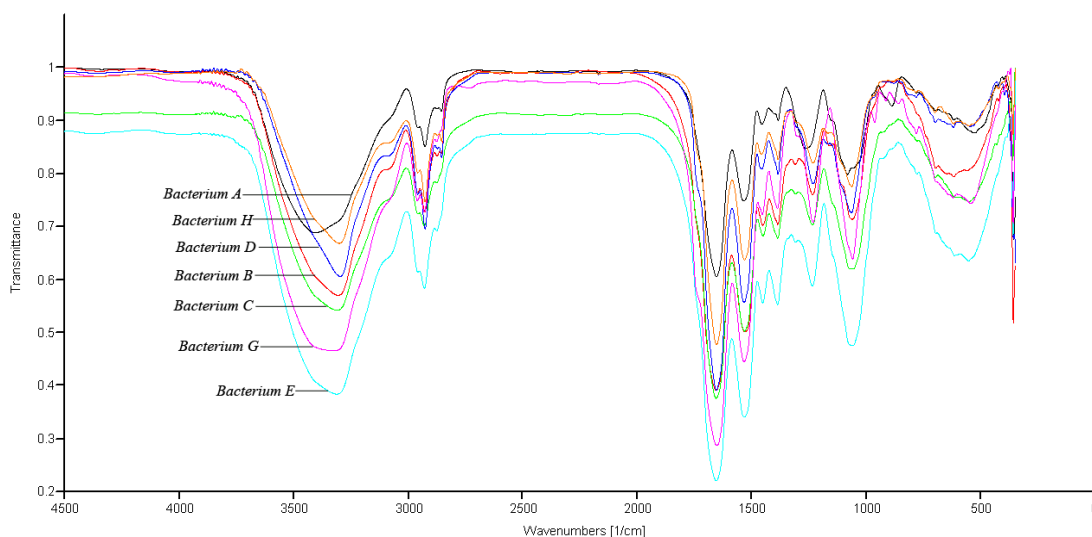
همچنین، برای نشان دادن جایگاه این باکتری ها در میان باکتری های دیگر و بالا بردن دقت، توالی های نزدیک به هر یک از این باکتری ها نیز که از NCBI



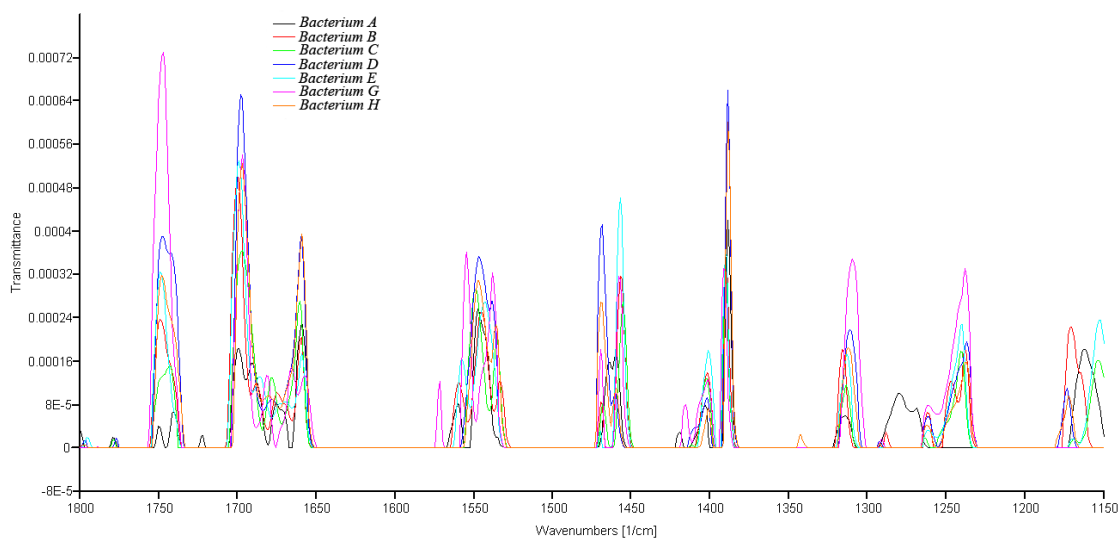
شکل ۳- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از توالی های باکتری های متیلوتروف مورد نظر و توالی های استخراج شده از NCBI که موقعیت تاکسونومیک این هفت باکتری را نشان می دهد.

طیف عبوری باکتری‌های مختلف در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ در شکل ۴ نشان داده شده است. نکته شایان توجه این است که در یک نگاه کلی طیف‌ها شباهت زیادی به یکدیگر دارند و نمی‌توان تفاوت چندانی بین آنها مشاهده کرد. اما چنان که در شکل ۵ نشان داده شده است با مشتق گرفتن از این طیف‌ها بخش‌هایی از آنها حذف شده، در نواحی باقی مانده بخش‌های مشترک و عدد موج‌های ارزشمندی برای مقایسه طیف‌های باکتری‌های مختلف را مشخص می‌کند.

در این دندروگرام (شکل ۳) نیز تقریباً همان ترتیب جدا شدن باکتری‌ها و قرار گرفتن آنها در شاخه‌ها و خوشه‌ها در میان باکتری‌های دیگر مشاهده شد البته با این تفاوت که باکتری C که در شاخه جداگانه‌ای قرار گرفته بود در دندروگرام جدید در همسایگی خوشه‌ای قرار دارد که باکتری‌های A، D و H بر روی آن قرار دارند و در واقع به این سه باکتری نزدیکتر است تا به باکتری‌های G و B. در این دندروگرام نیز باکتری E در شاخه‌ای به صورت کاملاً مستقل از شش باکتری دیگر قرار گرفته است.

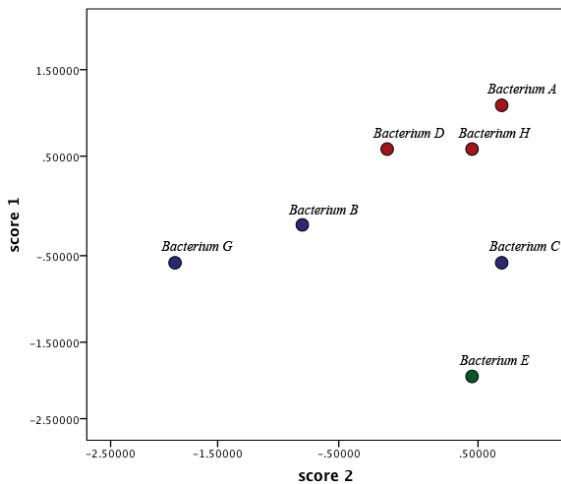


شکل ۴- طیف عبوری باکتری‌های مختلف در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ ، در یک دید کلی طیف‌ها شباهت زیادی به یکدیگر دارند.



شکل ۵- بخشی از مشتق طیف‌های عبوری باکتری‌ها ($1800-1150 \text{ cm}^{-1}$). در این شکل نواحی حفاظت شده عدد موج‌ها را می‌توان مشاهده کرد که نواحی ارزشمند به منظور بررسی در باکتری‌های مورد مطالعه هستند.

متیلوتروف مطالعه شده در شکل ۷ نشان داده شده است. چنان که مشاهده می‌شود الگوی تمایز و جدایی آنها از یکدیگر تا حد زیادی شبیه به الگویی است که در روش HCA یا حتی 16S rDNA دیده می‌شود. دو باکتری D و H کاملاً نزدیک به هم قرار دارند و باکتری A نیز با فاصله اندکی در کنار آنها قرار گرفته است و می‌توان آنها را کاملاً به صورت دسته‌ای جداگانه در نظر گرفت. باکتری‌های B و G تا حدودی نزدیک به هم و با فاصله اندکی از بقیه باکتری‌ها قرار دارند و باکتری C نیز اندکی دورتر از آنها قرار گرفته است. اما باکتری E کاملاً مجزا و دور از سایر باکتری‌ها قرار دارد و تمایز آشکاری را با بقیه نشان می‌دهد.

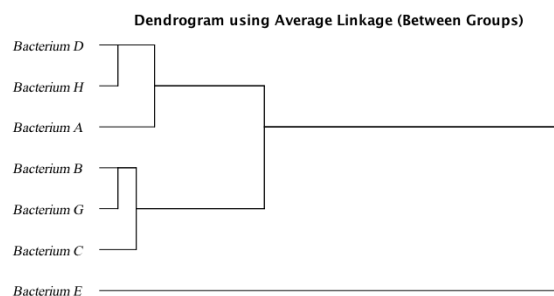


شکل ۷- نتیجه حاصل از تحلیل داده‌های FTIR با روش PCA

بحث و نتیجه‌گیری

تحلیل توالی 16S rDNA امروزه به عنوان روشی استاندارد و قابل قبول برای شناسایی و تاکسونومی باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد اما روشی وقت‌گیر و پُر هزینه محسوب می‌شود. بنابراین، یافتن روش‌های قابل اطمینان اما سریع‌تر و ارزان‌تر برای این منظور یکی از نکات مورد توجه پژوهشگران بوده است که FTIR یکی از این روش‌هاست. طی چندین سالی

نتیجه حاصل از تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ با روش HCA دندروگرامی است که در شکل ۶ نشان داده شده است. چنان که در این دندروگرام مشاهده می‌شود همانند دندروگرام ترسیم شده با MEGA5 باکتری‌های D و H در کنار هم، در یک خوشه از باکتری A جدا شده‌اند اما این سه باکتری با شباهت بیشتری که به هم داشته‌اند خوشه‌ای را تشکیل داده و از سایر باکتری‌ها جدا گردیده‌اند. دو باکتری B و G نیز در کنار هم یک خوشه را تشکیل داده و از باکتری C جدا شده‌اند ولی هر سه آنها نیز با توجه به نزدیکی‌شان به یکدیگر بر روی یک خوشه قرار گرفته و از سه باکتری قبل جدا شده‌اند. در اینجا نیز همانند دندروگرام ترسیم شده با اطلاعات توالی 16S rDNA، باکتری E اساساً به صورت یک شاخه مستقل از سایر باکتری‌ها جدا شده است. نکته جالب توجه در اینجا شباهت قابل ملاحظه‌ای است که دندروگرام ترسیم شده با اطلاعات توالی‌های نوکلئوتیدی با دندروگرام ترسیم شده با روش FTIR و بر اساس اطلاعات فیزیکی-شیمیایی ساختار باکتری دارد و به طور کلی اختلاف اصلی این دو نمودار مربوط به جایگاه باکتری C است.



شکل ۶- دندروگرام حاصل از HCA با روش UPGMA بر روی داده‌های FTIR مربوط به هفت باکتری متیلوتروف

نتیجه حاصل از تحلیل داده‌های FTIR با استفاده از نرم‌افزار SPSS با روش PCA برای هفت باکتری

این مسأله وجود نداشته است (Zhao *et al.*, 2006)؛
(Davis and Mauer, 2010).

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر برای مقایسه روش‌های FTIR و 16S rDNA و کارآیی آنها در شناسایی و تاکسونومی باکتری‌های متیلوتروف نشان داد که FTIR روش مناسبی برای تشخیص و تفکیک و تمایز باکتری‌ها از یکدیگر است که می‌توان نتایج آن را با روش 16S rDNA قابل مقایسه دانست. در مورد باکتری‌های D و H توالی 16S rDNA آنها کاملاً شبیه به هم بوده، هیچ تفاوتی را نشان نمی‌دهند اما طیف‌های FTIR این دو باکتری هرچند شبیه هم هستند اما کاملاً یکسان و منطبق بر هم نیستند. این یافته تأیید کننده یافته‌های Zhao و همکاران (۲۰۰۶) است. آنها توانستند با استفاده از FTIR و تحلیل نتایج آن با PCA چهار جدایه از *Streptomyces* را که از نظر توالی 16S rDNA صد در صد با هم شباهت داشتند اما بر اساس ظاهر میسلیموم، اسپور و رنگدانه با هم متفاوت بودند، از یکدیگر تفکیک کنند.

با توجه به این که در این تحقیق مطالعه باکتری‌ها در سطح جنس صورت گرفته است کارآیی روش FTIR را می‌توان تنها در این سطح با اطمینان تأیید کرد. اما این که روش مذکور تا چه سطحی می‌تواند برای تمایز باکتری‌ها کارآیی داشته باشد نیاز به بررسی بیشتر دارد. Oberreuter و همکاران (۲۰۰۲) که تنوع درون گونه‌ای را در سه باکتری اکتینومیست *Brevibacterium glutamicum* *linens* و *Corynebacterium* با استفاده از هر دو روش بررسی کرده‌اند، معتقدند که کارآیی FTIR تنها تا سطح گونه است و در سطح زیرگونه نمی‌تواند معیار مناسبی برای بررسی ارتباط تاکسونومیک باشد. زیرا

که از مطرح شدن FTIR به عنوان روشی کاربردی در میکروبیولوژی می‌گذرد پژوهش‌های مختلفی در این زمینه صورت گرفته است. Davis و Mauer (۲۰۱۰) معتقدند این روش می‌تواند برای تشخیص، تفکیک و سنجش کمی باکتری‌ها جایگزین ابزارهای تشخیصی رایج در صنایع غذایی، دارویی و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی گردد. Duygu و همکاران (۲۰۰۹) مزایای FTIR را سرعت بالای آن نسبت با روش‌های رایج و اختصاصیت آن می‌دانند که می‌تواند در اپیدمیولوژی و کنترل آلودگی‌ها به کار رود. Ammann و Brandl (۲۰۱۱) مزیت FTIR را نیاز به مقادیر اندک نمونه و اختصاصیت بالای آن برای تشخیص اسپور باکتری‌ها حتی در حضور سایر مواد آلی در خاک ذکر می‌کنند. بررسی‌های دیگری نیز که در این زمینه صورت گرفته بیشتر بر روی تشخیص و کنترل پاتوژن‌ها در آب، مواد غذایی و نوشیدنی‌ها متمرکز بوده است که از آن جمله می‌توان به Al-Qadiri و همکاران (۲۰۰۶ و ۲۰۰۸)، Holt و همکاران (۱۹۹۵)، Lin و همکاران (۲۰۰۴) و Rodriguez و همکاران (۲۰۰۴) اشاره کرد. عیب بزرگی که برخی از این پژوهشگران بر آن تأکید می‌کنند نبود بانک جامع اطلاعاتی برای داده‌های طیفی باکتری‌ها در روش FTIR است (Al-Qadiri *et al.*, 2006؛ Ammann and Brandl, 2011).

علاوه بر موارد اشاره شده، برخی از پژوهشگران کارآیی FTIR را به عنوان روشی مناسب برای استفاده در تاکسونومی باکتری‌ها نیز ارزیابی کرده‌اند که برخی آن را تأیید و نتایج آن را قابل مقایسه با روش 16S rDNA و حتی بهتر از آن می‌دانند و برخی نیز آن را زیر سؤال برده‌اند اما تاکنون توافق نظر کاملی بر روی

علاوه بر موارد ذکر شده درباره حساسیت و دقت روش FTIR مزیت مهم دیگری که می‌توان به آن اشاره کرد این است که تجهیزات و وسایل زیادی نیاز ندارد و میزان مواد مورد استفاده در این روش نیز قابل مقایسه با روش 16S rDNA نیست به طوری که می‌توان گفت در روش FTIR تقریباً هیچ ماده دیگری به جز KBr استفاده نمی‌شود و بنابراین از نظر هزینه بسیار ارزان‌تر و به صرفه‌تر است. مزیت مهم دیگر زمان بسیار اندکی است که برای انجام آزمون بر روی هر نمونه در روش FTIR مورد نیاز است که این زمان از چند دقیقه تجاوز نمی‌کند در حالی که در روش 16S rDNA این زمان به چندین ساعت می‌رسد. نکته آخر این که برخلاف توالی 16S rDNA که بانک‌های اطلاعاتی و پایگاه داده‌های بزرگ و روبه گسترشی دارد، تاکنون چنین مرجعی برای داده‌های FTIR باکتری‌ها فراهم نشده است که این بزرگترین عیب روش FTIR بوده و محدودیت زیادی برای کاربردی شدن این روش و استفاده از آن برای بررسی‌های تاکسونومیک و فیلوژنیک در سطح وسیع به وجود آورده است.

هرچند با این روش تنوعاتی در سطح زیرگونه دیده می‌شود اما این تنوعات متفاوت از تنوعاتی است که با روش 16S rDNA بین سویه‌ها مشاهده می‌شود. در مقایسه نتایج به دست آمده برای گروه بندی باکتری‌ها، به جز جایگاه باکتری C نتایج تا حد بسیار زیادی در هر دو روش مشابه یکدیگرند. با توجه به این که روش‌های آماری مختلف برای تفسیر داده‌های FTIR نتایج کاملاً یکسانی ندارد بنابراین جایگاه باکتری‌ها در هر روش می‌تواند با روش دیگر متفاوت باشد و این امر اهمیت چگونگی تحلیل داده‌ها و تفسیر نتایج را بیشتر مشخص می‌کند. با توجه به نتایج به دست آمده کارآیی FTIR را نه می‌توان کاملاً تأیید و نه کاملاً رد کرد شاید تلفیقی از هر دو روش نتیجه بهتری در بر داشته باشد. بر اساس یافته‌های Lin و همکاران (۲۰۰۷) برای تحلیل فیلوژنیک جدایه‌هایی از باکتری *Alicyclobacillus* با استفاده از دو روش FTIR و 16S rDNA ترکیبی از هر دو روش است که می‌تواند ابزار مناسبی برای شناسایی و تمایز سریع و مطمئن باکتری‌ها فراهم کند.

منابع

- Al-Qadiri, H. M., Al-Holy, M. A., Lin, M., Alami, M. I., Cavinato, A. G. and Rasco, B. A. (2006) Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5749-5754.
- Al-Qadiri, H. M., Lin, M., Al-Holy, M. A., Cavinato, A. G. and Rasco, B. A. (2008) Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* serotype typhimurium and *Listeria monocytogenes* using fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy (4000 to 600 cm^{-1}). *Journal of Food Science* 73: M54-M61.
- Ammann, A. B. and Brandl, H. (2011) Detection and differentiation of bacterial spores in a mineral matrix by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometrical data treatment. *BMC Biophysics* 4: 14.
- Balachandar, D., Raja, P. and Sundaram, S. P. (2008) Genetic and metabolic diversity of pink-pigmented facultative methylotrophs in phyllosphere of tropical plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 68-73.

- Davis, R. and Mauer, L. J. (2010) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. In: Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology (Ed. Mendez-Vilas, A.) 2: 1582-1594. Formatex Research Center, Badajoz, Spain.
- Duygu, D., Baykal, T., Acikgoz, I. and Yildiz, K. (2009) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies. Gazi University Journal of Science 22: 117-121.
- Holt, C., Hirst, D., Sutherland, A. and McDonald, F. (1995) Discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variate analysis. Applied and Environmental Microbiology 61: 377-378.
- Ivanova, E. G., Doronina, N. V., Shepelyakovskaya, A. O., Laman, A. G., Brovko, F. A. and Trotsenko, Y. A. (2000) Facultative and obligate aerobic *Methylobacteria* synthesize cytokinins. Microbiology 69: 646-651.
- Leisinger, T. and Braus-Stromeyer, S. (1995) Bacterial growth with chlorinated methanes. Environmental Health Perspective 103(Suppl5): 33-36.
- Lin, M., Al-Holy M., Al-Qadiri, H., Chang, S., Kang, D. H., Rodgers, B. D. and Rasco, B. A. (2007) Phylogenetic and spectroscopic analysis of *Alicyclobacillus* isolates by 16S rDNA sequencing and mid-infrared spectroscopy. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety 1: 11-17.
- Lin, M., Al-Holy, M., Al-Qadiri, H., Kang, D. H., Cavinato, A. G., Hung, Y. and Rasco, B. A. (2004) Discrimination of intact and injured *Listeria monocytogenes* by fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 5769-5772.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. and Wade, W. G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 64: 795-799.
- Ntsaluba, L., Agundiade, Q., Mabinya, L. and Okoh, A. (2011) Studies on bioflocculant production by *Methylobacterium* sp. Obi isolated from a freshwater environment in South Africa. African Journal of Microbiology Research 5: 4533-4540.
- Oberreuter, H., Charzinski, J. and Scherer, S. (2002) Intraspecific diversity of *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Microbiology 148: 1523-1532.
- Rodriguez-Saona, L. E., Khombaty, F. M., Fry, F. S., Dabojs, J. and Calvey, E. M. (2004) Detetion and identification of bacteria in a juice matrix with fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. Journal of Food Protection 67: 2555-2559.
- Salman, A., Tsrer, L., Pomerants, A., Moreh, R., Mordechai, S. and Huleihel, M. (2010) FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. Spectroscopy 24: 261-267.
- Trotsenko, Y. A. and Doronina, N. V. (2003) The biology of methylobacteria capable of degrading Halomethanes. Microbiology 72: 121-131.
- Zhao, H., Parry, R. L., Ellis, D. I., Griffith, G. W. and Goodacre, R. (2006) The rapid differentiation of *Streptomyces* isolates using fourier transform infrared spectroscopy. Vibrational Spectroscopy 40: 213-218.

Comparison of FTIR and 16S rDNA sequencing methods for identification and taxonomy of methyloleophilic bacteria

Isaac Zamani, Majid Bouzari * and Giti Emtiazi

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Molecular methods such as 16S rDNA sequencing are relatively accurate but are costly and time consuming, therefore new alternative methods have been a matter of interest. FTIR (Fourier Transform Infrared) is one of these methods. It is a physico-chemical method based on measurement of molecular bond vibrations excited by infrared radiation at specific wavelength range. The aim of this study was to assess efficiency of FTIR in identification and taxonomy of methyloleophilic bacteria (most important group of chlorinated methane derivative degrading bacteria) and comparing it to 16S rDNA sequencing method. Of 30 isolated methyloleophilic bacteria, 7 were selected. Following amplification of a portion of 16S rDNA gene by PCR and sequencing, a phylogenetic tree was constructed. By FTIR method, transmittance spectra of these bacteria were obtained in infrared region 400-4000 cm⁻¹. FTIR data were analyzed by SPSS software. The dendrogram of FTIR data analysis was very similar to dendrogram of 16S rDNA sequencing. Results showed that FTIR can be used as an identification method but not yet for taxonomy. By introducing a standard method for FTIR data analysis, this method can be considered as an alternative to the 16S rDNA sequencing method.

Key words: Taxonomy, Methyloleophiles, 16S rDNA, FTIR

* bouzari@scu.ui.ac.ir