مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۶، شماره ۲، تابستان ۹۵، صفحات ۸۲ تا ۸۸

Original Article

جداسازی متانوبروی باکتر اسمیتی از نمونه مدفوع انسان با استفاده از ژن اختصاصی rpoB

شقایق برادران قوامی[۱]، عباس اخوان سپهی[۲]، حمید اسدزاده عقدایی [۳]، طاهر نژادستاری[۴]، محمد رضا زالی[۵]

[۱] دکتری میکروب شناسی،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران
[۲] دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[۳] استادیار، فوق تخصص گوارش و کبد ، مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمولوژی بیماری‌های دستگاه گوارش، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۴] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران
[۵] استاد، فوق تخصص گوارش وکبد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *آرکی‌ها میکروارگانیسم‌های اکستروترموفیل هستند که سال‌ها تصور بر آن بود که تنها می‌توان آنها از محیط‌های با شرایط دشوار از قبیل آتشفشان‌ها ، اعماق اقیانوس‌های و دریاچه‌های پرنمک به دست آورد. اما امروزه مشخص شده است که دسته‌ای از این آرکی‌ها ساکن دستگاه گوارش موجودات زنده از قبیل پستانداران، سخت پوستان و انسان هستند. از مهم‌ترین سویه شناسایی شده آرکی‌ها در دستگاه گوارش، می توان به Methanobrevibacter smithii اشاره کرد. در این مطالعه، برای اولین بار آرکی متانوژن به صورت بومی جداسازی شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه DNA آرکی از نمونه های مدفوع ۲۰ فرد سالم با معیار های مورد نظراستخراج و سپس PCR آن در شرایط بهینه صورت گرفت، همچنین برای اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر (rpoB) هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودکننده انجام شد و در انتها نمونه ها در داخل E.coli(DH5α) کلون و تعیین توالی شدند.*

یافته‌ها: *از بین ۲۰ نمونه مدفوع، در ۱۸ نمونه جواب PCR (۹۰٪) مثبت گزارش شد. جواب‌های مثبت به کمک آنزیم محدودالاثر AVAII تایید شدند و نتایج سکانس در سایت NBCI بررسی شد و مشخص شد نمونه جدا شده آرکی Methanobrevibacter smithii است.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان می‌دهد با توجه به تنوع میکروارگانیسم‌ها در دستگاه گوارش، تعیین ژن اختصاصی و عدم داشتن همولوژی با سایر میکروارگانیسم‌ها در جداسازی آرکی بسیار حایز اهمیت است.*

واژگان کلیدی: *متانوبروی باکتر اسمیتی، آرکی، مدفوع ، ژن rpoB*

مقدمه

آرکی (*Archaea*) از ریشه لغت یونانی به معنای قدیمی و باستانی گرفته شده است و آرکی‌ها به میکروارگانیسم‌های باستانی مشهور هستند (۱, ۲). این میکروارگانیسم‌ها در شرایط بسیار سخت محیطی (Extremophiles) قادر به ادامه حیات هستند؛ به همین دلیل به طور گسترده‌ای در شرایط مختلف محیطی از قبیل از دریاچه‌های نمک، آب‌های بسیار اسیدی یا بسیار قلیایی، آتشفشان‌ها، مردآب‌ها، یخچال‌های طبیعی و همچنین در اعماق اقیانوس‌ها می‌توانند به حیات خود ادامه دهند (۵-۳).

در ابتدا تصور بر این بود، آرکی‌ها و باکتری‌ها به دلیل برخی از شباهت‌های ظاهری، از قبیل اندازه و شکل‌شان، در یک گروه قرار گیرند، اما پس از پیشرفت‌های مولکولی در اواخر دهه ۱۹۷۰ توسط Carl Woese و همکارانش با بررسی مولکولی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،حمید اسدزاده عقدایی (**email**: hamid.assadzadeh@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۵/۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۲۷

Archive of SID
www.SID.ir

ژن حفاظت شده 16srRNA به این نتیجه رسیدند که آرکی‌ها به یک قلمرو جداگانه وابسته هستند (۶, ۷) و حیات را به سه قلمرو مجزا که عبارت بودند از یوکاریوتا (Eukaryota)، یوباکتری‌ها (Eubacteria) و آرکی‌ها تقسیم بندی کردند (۸).

با توجه به بررسی‌ها و یافتن شباهت‌های فراوانی در مسیرهای بیوشیمیایی، ژنتیک، رونویسی و بیان ژن‌ها معلوم شد که آرکی‌ها بیش از آن که شبیه باکتری‌ها باشد به یوکاریوت‌ها شباهت‌های فراوان‌تری دارد. آرکی‌ها دارای غشای سلولی حاوی لیپیدهای اتر-گلیسرول هستند که افزایش دهنده استحکام غشا سلولی است (شبیه غشای یوکاریوت‌ها) و در نهایت منجر به پایداری آنها در برابر شرایط دشوار زیست محیطی می‌شود (۱).

در مطالعات گوناگونی، آرکی‌ها را از دستگاه گوارش مورچه، پستانداران و انسان جدا کرده‌اند (۲). گونه غالب شناسایی شده، *Methanobrevibacter* از راسته متانوژن‌ها است. آرکی‌ها به ۷ شاخه تقسیم می‌شوند که دو شاخه عمده آنها *Euryarchaeota* و *Crenarchaeota* هستند. متانوژن‌ها متعلق به شاخه *Euryarchaeota* هستند. علاوه بر متانوژن‌ها، گزارش‌هایی حاکی بر جداشدن هالوفیل از دستگاه گوارش انسان نیز وجود دارد (۹, ۱۰).

متانوژن‌ها می‌توانند از هیدروژن تولید شده در دستگاه گوارش استفاده کنند و به کمک دی اکسید کربن، متان تولید کنند که این عمل متانوژنزیز نام دارد. متانوژن‌ها به میکروارگانیسمهای سلولیتیک در تخمیر پلی ساکاریدها و سلولز کمک کرده تا گاز هیدروژن و سایر محصولات تولیدشده توسط سایر میکروبیوتا های را تعدیل نمایند (۸). به بیان دیگر، آرکی متانوژن‌ها با سایر میکروبیوتاهای دستگاه گوارش رابطه سمبیوسیز و سینتروفی دارند (۱, ۱۱).

گونه *Methanobrevibacter* که در روده بزرگ انسان و واژن یافت می‌شود *Methanobrevibacter smithi* نام دارد که در حدود ۹۵ درصد از افراد نرمال جامعه حامل این آرکی در دستگاه گوارش هستند (۸). ازدسته دوم آرکی‌ها که به مراتب شیوع و پراکندگی کمتری نسبت به *M.smithii* دارند، می‌توان به *Methanosphaera stadtmane* اشاره کرد که در حدود ۲۹/۴ درصد از افراد دارای این نوع از آرکی در دستگاه گوارش هستند.

در حال حاضر این فرضیه مطرح است که با توجه به فراوانی بالای *M.smithii* در دستگاه گوارش، از آن می‌توان به عنوان یک شاخص تعیین آلودگی آب به فاضلاب استفاده کرد (۱۲). همچنین احتمال دارد آرکی‌ها در بروز برخی از بیماری‌های گوارشی، از قبیل سندرم روده تحریک پذیر (IBS)، بیماری التهابی روده (IBD)، سرطان کولون، عفونت پلاک‌های دندانی و همچنین در چاقی دخالت داشته باشند (۱۳, ۱۴).

با توجه به نقش متانوژن‌ها در چرخه تجزیه مواد آلی و بروز بعضی از بیماری‌ها، فرایند جداسازی و شناسایی آنها از اهمیت بالای برخوردار است. آرکی ها از لحاظ ساختاری و دیواره سلولی تفاوت‌هایی با باکتری‌ها دارند که باید در جداسازی آرکی‌ها در نظر گرفته شود. در ارتباط با انتخاب پرایمر نیز هر چقدر میزان اختصاصی بودن پرایمر بیشتر باشد، حساسیت و جداسازی آن با دقت بیشتری انجام می‌پذیرد. با توجه به اینکه در روده میکروفلورها بسیار زیادند و احتمال دارد که هم پوشانی بین ژن‌های باکتری‌ها و آرکی‌ها رخ دهد، در این مطالعه از دو پرایمر، Met83F/Met1340R که ناحیه حفاظت شده 16srRNA را در متانوژن‌ها شناسایی می‌کند و پرایمر اختصاصی ژن *rpoB* که زیر واحد β آنزیم RNAپلیمراز را کد می‌کند و به طور اختصاصی *M.smithii* از سایر متانوژنها جدا می‌کند ، استفاده شد. هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی *M.smithii* برای اولین از بین سویه‌های ایرانی توسط ژن اختصاصی *rpoB* بود.

مواد و روشها

این مطالعه بر روی نمونه مدفوع ۲۰ نفر که به بیمارستان طالقانی تهران مراجعه کرده بودند و دارای شرایط لازم برای شرکت دراین مطالعه بودند، صورت گرفت. افراد بیش از ۱۰ سالی که در طی چهار هفته گذشته هیچ گونه آنتی بیوتیکی مصرف نکرده بودند، وارد مطالعه شدند. قبل از دریافت نمونه از تمام شرکت کننده ها دراین مطالعه، رضایت نامه اخذ شد. نمونه‌های مدفوع دریافت شده بلافاصله به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA انتقال داده شدند.

استخراج DNA از نمونه مدفوع

پس از آماده سازی اولیه نمونه‌ها، برای استخراج DNA آرکی از کیت (QIAamp DNA Stool Mini Kit; Qiagen, Germany) استفاده شد. به اندازه ۲ میکروگرم از مدفوع در میکروتیوپ ۲mL با ۱mL از بافر لیز کننده (حاوی ۴٪ سدیم دودسیل سولفات (SDS)، ۵۰ میلی مول Tris-HCl با pH برابر ۷/۶، ۵۰۰ میلی‌مول محلول NaCl و۵۰میلی مول محلول EDTA مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در آبجوش حرارت داده شد. سپس ۱ml از بافر Inhibit EX کیت به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد.

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه مسیر استخراج طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. همچنین برای یافتن روش بهینه استخراج DNA آرکی، نمونه‌ها یک بارهم بدون آماده سازی اولیه فقط طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، استخراج آنها صورت گرفت. سپس نتایج به دست آمده مورد مقایسه قرار گرفت.

اندازه گیری غلظت DNA استخراج شده

پس از استخراج، میزان غلظت DNA توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر NanoDrop ND-1000 (Thermo, USA) اندازه گیری و DNA استخراج شده در دمای ۲۰ - درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

پرایمرهای مورد استفاده

در این مطالعه، از دو نوع پرایمر استفاده شد. پرایمر اول Met86 F/Met1340R بود که ناحیه حفاظت شده 16srRNA را در آرکی متانوژن شناسایی می‌کند (۱۵) و پرایمر دوم rpoB F/R بود که اختصاصی آرکی *M.smithii* است و هیچ ژن مشابه دیگری را در باکتری شناسایی نمی‌کند (۱۶). در جدول ۱ مشخصات این پرایمرها به تفصیل آمده است.

واکنش PCR درحجم نهایی ۲۵µL با دستگاه ترموسایکلر (Ephendorf master cycler, EP5341) به شرح ذیل انجام شد. مخلوط PCR، حاوی ۵µL بافر ۱۰X، ۲۰۰mL dNTPs، ۰/۸µm از هر کدام از پرایمرها، ۲µL از DNA مورد نظر و در نهایت ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase به مخلوط اضافه شد.

واکنش PCR طبق برنامه زیر صورت پذیرفت. واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه از دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه (برای Met دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱دقیقه، برای *rpoB* دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، ۵۹ تا ۶۲/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (۶۲/۵درجه سانتی‌گراد برای Met، ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای *rpoB*) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد انتهایی به مدت ۳۰ ثانیه تا ۷ دقیقه (برای Met ۷دقیقه، برای *rpoB* ۳۰ ثانیه) جهت تکثیر نهایی اعمال شد. در انتها، محصول PCR ژن *rpoB* بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شده تا باند ۷۰ جفت بازی مشاهده شود. همچنین ژل آگارز ۲/۵٪ برای مشاهده باند ۱۴۰۰ جفت بازی ژن Met مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز کنترل مثبت

جهت تهیه سوش استاندارد آرکی *M.smithii* و استفاده آن به عنوان کنترل مثبت، ۱۶۱ جفت باز از ژن *rpoB* توسط کشور کره جنوبی (Generay company, South Korea) سنتز و بر روی پلازمید PUC56 کلون شد و به عنوان کنترل مثبت در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

تایید نتیجه PCR

برای اطمینان از اینکه قطعه تکثیر شده همان ژن مورد نظر است، از سایت اختصاصی (http://rna.lundberg.gu.se/cgi-bin/cutter2/cutter) آنزیم محدودکننده‌ای که فقط یک منطقه برش بر روی ژن مورد نظر را داشته باشد (AVAII) انتخاب شد. بررسی‌ها نشان می‌دهد آنزیم AVAII محصول PCR ۷۰ جفت بازی را در یک نقطه برش ایجاد می‌نماید و آن را به یک قطعه ۱۵ جفت بازی و ۵۶ جفت بازی تقسیم می‌کند. آزمایش RFLP-PCR به طور خلاصه بدین شرح انجام شد که به اندازه ۱۵µL از محصول PCR برداشته و سپس به اندازه ۱۰ µL از آنزیم AVAII پس از اضافه نمودن بافر به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای مشاهده نتیجه اثر آنزیم، به دلیل آنکه قطعات حاصل از هضم آنزیم از اندازه کوچکی برخوردار بودند از ژل پلی اکریلامید (SDS-PAGE) استفاده شد.

TA کلونینگ

از بین نمونه‌هایی که نتیجه PCR آنها مثبت شده بودند، چند نمونه انتخاب و با استفاده از کیت TOPO TA Cloning Kit (for sequencing ,Carlsbad,CA 92008 USA) طبق

جدول۱. ویژگی پرایمر های مورد استفاده در واکنش PCR

Gene target	Primers	Nucleotide sequence (5´- 3´)	Amplicon size(bp)
Methanogen	Met86 F	GCTCAGTAACACGTGG	1400
	Met1340 R	CGGTGTGTGCAAGGAG	
M.smithii	rpoB F	AAGGGATTTGCACCCAACAC	70
	rpoB R	GACCACAGTTAGGACCCTCTGG	

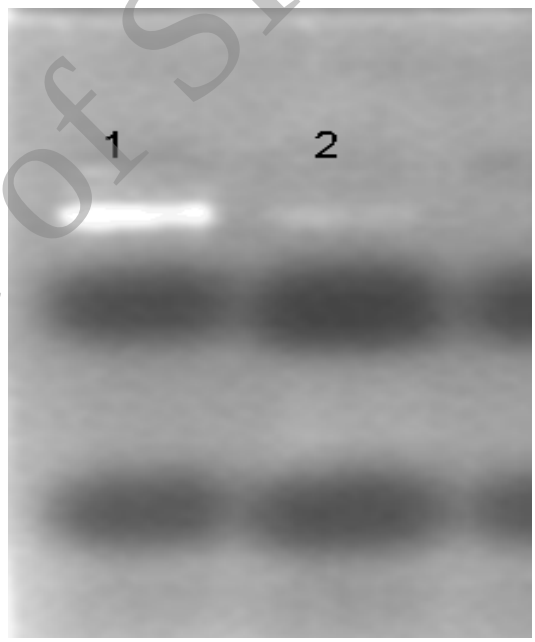
Archive of SID

www.SID.ir

پروتکل موجود در کیت کولون انجام گرفت. پس آنکه ژن rpoB در باکتری E.coli $DH_5\alpha$ کولون شد، آن را بر روی محیط کشت LB آگار که حاوی ۵۰µg/ml آنتی بیوتیک کاناماسین بود، کشت دادند، ۲۴ ساعت بعد کلنی های سفید رنگی که حاوی پلاسمید نوترکیب است مشاهده شد. سپس توسط کیت QlAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) پلاسمید استخراج و برای انجام سکانس فرستاده شد.

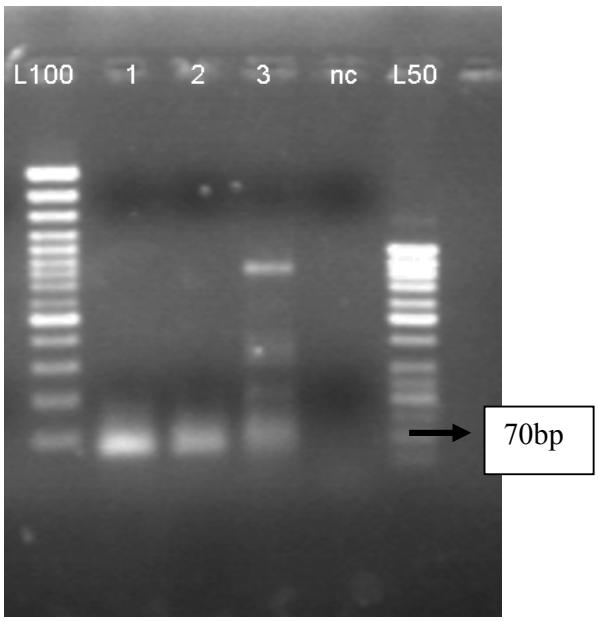
یافته‌ها

ابتدا نتایج DNA های استخراج شده براساس دو روش استخراج مقایسه شد و معلوم شد از روش اول که در آن از شوک حرارتی استفاده شده بود، میزان بیشتری DNA آرکی (OD= ۱۷۲,۳) به دست می‌آید (شکل ۱).



شکل۱. نمونه شماره ۱: DNA استخراج شده با شوک حرارتی به همراه کیت استخراج دارای DNA OD=172.3، نمونه ۲: DNA استخراج شده فقط با کیت استخراج DNA با OD=94.5

به همین دلیل، بقیه نمونه‌ها بر اساس روش اول استخراج شدند. PCR پرایمر Met، حضور متانوژن‌ها را در نمونه مدفوع تایید کرد. از ۲۰ نمونه مورد مطالعه، براساس پرایمر *rpoB* تنها در ۱۸ نمونه (۹۰ درصد) باند مثبت ۷۰ bp مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲. نمونه‌های شماره ۱و ۲ باند ۷۰جفت بازی ژنrpoB را نشان می دهد. نمونه شماره ۳ جواب PCR باند بیشتر از ۷۰ جفت بازی را نشان می دهد و جواب آن منفی است.

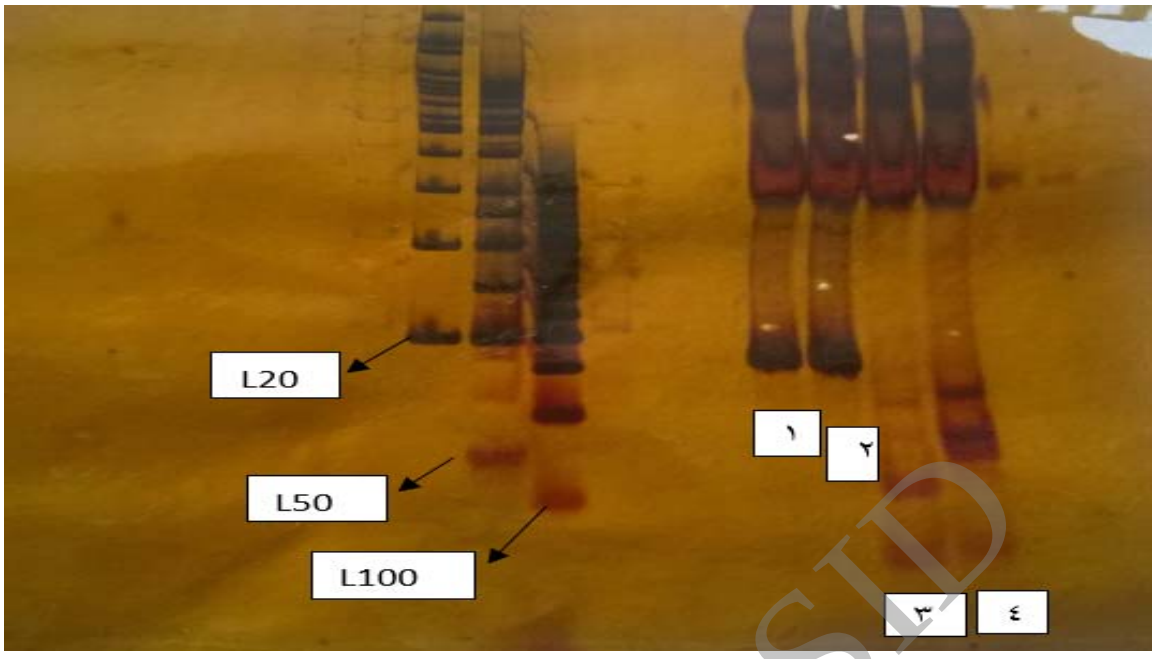
نمونه‌های انتخاب شده توسط آنزیم کننده AVAII بر روی SDS- PAGE انتقال داده شدند و قطعات ۱۵ و ۵۶ جفت بازی حاصل از هضم آنزیمی آشکار شد و نتیجه PCR ژن *rpoB* بدین گونه مورد تایید قرار گرفت . اما برای اطمینان بیشتر نمونه‌های کلون شده که برای تعیین توالی فرستاده شده بودند، نتایج تعیین توالی آن در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد نمونه جدا شده آرکی *M.smithii* است و توانستیم برای اولین بار در ایران سویه بومی آرکی *Methanobrevibacter smithii* را از مدفوع جداسازی کنیم.

بحث

امروزه شناسایی و جداسازی آرکی‌های متانوژن، به دلیل نقش‌های متفاوتی که در دستگاه گوارش ایفا می‌کنند، از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به اینکه آرکی‌ها دارای تفاوت‌هایی در ساختار دیواره سلولی با باکتری‌ها هستند، پروتکل‌ها و روش‌های آزمایشگاهی از قبیل استخراج DNA و کشت دادن آنها دارای تفاوت‌هایی با سایر باکتری‌ها است. لذا نمی‌توان دقیقا همان روش‌های آزمایشگاهی روتین باکتری را برای شناسایی آرکی‌ها مورد استفاده قرار داد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳. نتیجه آنالیز آنزیم محدودالاثر AVAII که نمونه ۱و۲ نتیجه منفی ، نمونه ۳و۴ توسط آنزیم هضم شده و باند های ۱۵ و ۵۶ جفت بازی بدست آمد.

در این مطالعه، با مقایسه دو روش استخراج DNA و انتخاب روش بهتر که همان روش شوک حرارتی بود، توانستیم میزان بیشتری از DNA آرکی متانوژن را استخراج کنیم. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که متانوژن‌ها به شدت به پروتئیناز K مقاوم هستند (۱۹-۱۷) و تنها استفاده از کیت‌های تجاری استخراج DNA برای افزایش کیفیت استخراج DNA آرکی کافی نیست؛ در نتیجه نیاز به یک روش فیزیکی است تا دیواره آرکی سست و DNA بیشتری خارج شود. به کمک ژن *rpoB*، از ۱۸ (۹۰ درصد) فرد، *M.smithii* جدا شد. نکته قابل توجه دیگر در جداسازی آرکی، توجه به پرایمر آن است. زیرا نوع طراحی پرایمر بستگی به محیطی دارد که جداسازی از آن صورت می‌گیرد. در جداسازی از باتلاق، مدفوع حیوانات و یا مدفوع انسان، پرایمر یکسانی استفاده نمی‌شود (۸)؛ همچنین هر چه اختصاصی بودن پرایمر بیشتر شود، جداسازی آن با دقت بیشتری صورت می‌گیرد. به طور مثال، پرایمر ژن *mcrA* علاوه بر *M.*smithii، سایر گونه‌های متانوژن را نیز می‌تواند شناسایی کند، اما پرایمر ژن‌های *rpoB* و *nifH* کاملا اختصاصی *M.smithii* است که در مطالعات قبلی از پرایمرهای اختصاصی نتیجه بهتری حاصل شده است (۱۲, ۲۰) نتایج به دست آمده از این مطالعه با سایر مطالعات مشابه مطابقت دارد.

Eckburg و همکارانش در سال ۲۰۰۵ به کمک آنالیز متاژنومیک در ۳ فرد مورد مطالعه نشان دادند که *M.smithii* ۱۱/۵٪ از فلوئور دستگاه گوارش افراد را تشکیل می‌دهد (۱۱). Samule و Gordon نشان دادند که آرکی متانوژن می‌تواند فعالیت و رشد میکروارگانیسم‌های مصرف کننده پلی‌ساکاریدها از قبیل *Bacteroides* و *Firmicutes* را از طریق حذف گاز هیدروژن، افزایش دهند (۲۱). در واقع، مهمترین نقش آنها جلوگیری از تجمع اسید به صورت غیرمستقیم است (۲۲)؛ همچنین به دلیل تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (SCFAs) از قبیل بوتیرات، پروپیونات و سوکسینات در روده و جذب آن ازطریق دیواره روده باعث تحمیل کالری اضافه در افراد می‌شود که در نهایت می‌تواند منجر به چاقی شود (۲۳, ۲۴). در واقع، نقش متانوژن‌ها به خصوص *M.smithii*، در چاقی، اهمیت شناسایی و جداسازی متانوژن‌ها را بیش از پیش کرده است. همچنین توانستند *M.smithii* را در افراد چاق به میزان 10^3 برابر افراد لاغر جداسازی کنند (۲۳).

Sahakian و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که در بچه‌های زیر ۳ سال، متانوژن‌ها قابل جداسازی نیستند. همچنین، آنها علاوه بر جداسازی متانوژن از مدفوع، از طریق تست تنفسی متان نیز حضور متانوژن‌ها رو اثبات کردند و

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه گرفتند در حدود ۷۲٪ از جمعیت‌ها حمل کننده متانوژن‌ها در دستگاه گوارش هستند (۲۵).

Dridi و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در بین یک جمعیت بزرگ ۶۵۰ نفری، میزان شیوع *M.smithii* را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند *M.smithii* از شیوع بالایی به میزان ۹۵/۵٪ و *M.stadtmane* از شیوع کمتری به میزان ۲۹/۴٪ در دستگاه گوارش برخوردار است (۱۹).

Ufnar و همکارانش از ۷۰ نمونه آب آلوده به فاضلاب نمونه برداری و *M.smithii* را جدا کردند. با مطالعات بیشتر متوجه شدند که *M.smithii* در سه منطقه مورد بررسی دارای سویه یکسانی هستند. براساس این مطالعه و سایر مطالعات به این نتیجه رسیدند که متانوژن‌ها، به ویژه *M.smithii*، می‌توانند در کنار انتروباکتریاسه‌ها، به عنوان شاخص تعیین آلودگی آب‌ها با فاضلاب استفاده شوند (۱۲).

از دیگر نقش‌های پراهمیت آرکی‌های متانوژن، جداسازی و یافتن متانوژن‌ها در بیماری‌های گوارشی، از قبیل بیماری التهابی روده (IBD)، سندرم روده تحریک پذیر (IBS)، سرطان کولون و علاوه بر آن در بیماری های دهان ودندان است (۱۳, ۱۸).

Scanlan و همکارانش با مطالعه گروه‌های مختلف بیماران و افراد سالم نتیجه گیری کردند که شیوع *M.smithii* ها بین افراد بیمار و سالم بسیار متفاوت است و فقط در ۲۴٪ بیماران مبتلا به IBD می‌توان *M.smithii* را شناسایی کرد. در صورتی که ۴۸٪ افراد سالم داری *M.smithii* بودند (۲۶). در مطالعه دیگری بر روی بیماران مبتلا به IBD که توسط Lecours و همکارانش انجام شد نتایج مشابهی به دست آمد (۲۷). در نهایت، شیوع متفاوت متانوژن‌ها در بین افراد سالم و بیمار باعث توجه بیشتر دانشمندان در دخالت آرکی در بیماری‌ها شد.

همچنین مطالعه‌ای روی بیماران IBS نشان داد که در این بیماران میزان *M.smithii* بیشتر از افراد سالم است، به خصوص وقتی این بیماران دچار یبوست‌های شدید و مزمن هستند (۱۶). علت آن را افزایش گاز متان حاصل از متانوژن‌ها بر روی حرکت عضلات دودی روده می‌دانند (۱۶, ۲۸).

با توجه به نقش بسیار گسترده آرکی متانوژن و تاثیرات محصولات نهایی آن بر روی دستگاه گوارش افراد به این نتیجه می‌رسیم که امروزه جداسازی وشناسایی آرکی‌ها از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. علاوه بر اهمیت آن در پزشکی، در صنعت و میکروب شناسی محیطی نیز حایز اهمیت فراوانی است، به طوری که امروز در کنار انتروباکتریاسه‌ها می‌تواند به عنوان شاخص تعیین آلودگی آب آشامیدنی به فاضلاب مورد استفاده قرار گیرد.

تشکروقدردانی

با سپاس فراوان از تمام همکاران شاغل در پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، از آقای دکتر عظیم زاده و همچنین خانم الهام رستمی که در انجام امور آزمایشگاهی به اینجانب یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA. Archaea and their potential role in human disease. Infect Immun 2003;71:591-96.
2. Pimentel M, Gunsalus RP, Rao SS, Zhang H. Methanogens in human health and disease. Am J Gastroenterol Suppls 2012; 1: 28-33.
3. Zhang H, Banaszak JE, Parameswaran P, Alder J, Krajmalnik-Brown R, Rittmann BE. Focused-Pulsed sludge pre-treatment increases the bacterial diversity and relative abundance of acetoclastic methanogens in a full-scale anaerobic digester. Water Res 2009;43:4517-26.
4. Miller TL, Wolin MJ, Conway de Macario E, Macario AJ. Isolation of Methanobrevibacter smithii from human feces. Appl Environ Microbiol 1982;43:227-32.
5. Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Normalization of lactulose breath testing correlates with symptom improvement in irritable bowel syndrome. a double-blind, randomized, placebo-controlled study. Am J Gastroenterol 2003;98:412-19.
6. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Natl Acad Sci U S A 1977;74:5088-90.
7. Raoult D. Mimivirus et l'histoire du vivant. Antibiotiques 2007;9:77-82.
8. Dridi B, Raoult D, Drancourt M. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. Anaerobe 2011; 17:56-63.
9. Oxley A, Lanfranconi MP, Würdemann D, Ott S, Schreiber S, McGenity TJ, et al. Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. Environ microbiology 2010;12:2398-410.
10. Nam YD, Chang HW, Kim KH, Roh SW, Kim MS, Jung MJ, et al. Bacterial, archaeal, and eukaryal diversity in the intestines of Korean people. J Microbiol 2008;46:491-501.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora Science 2005;308:1635-38.
12. Ufnar J, Wang SY, Christiansen J, Yampara Iquise H, Carson c, Ellender R. Detection of the nifH gene of Methanobrevibacter smithii: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters. J Appl Microbiol 2006;101:44-52.
13. Aminov RI. Role of archaea in human disease. Front Cell Infect Microbiol 2013;3:42.
14. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. T-RFLP-based mcrA gene analysis of methanogenic archaea in association with oral infections and evidence of a novel Methanobrevibacter phylotype. Oral Microbiol Immunol 2009;24:417-22.
15. Narihiro T, Sekiguchi Y. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. Microb Biotechnol 2011;4:585-602.
16. Kim G, Deepinder F, Morales W, Hwang L, Weitsman S, Chang C, Gunsalus R, Pimentel M. Methanobrevibacter smithii is the predominant methanogen in patients with constipation-predominant IBS and methane on breath. Dig Dis Sci 2012;57:3213-18.
17. Kubota K, Imachi H, Kawakami S, Nakamura K, Harada H, Ohashi A. Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. J Microbiol Methods 2008;72:54-9.
18. Horz HP, Conrads G. The discussion goes on: What is the role of Euryarchaeota in humans? Archaea. 2010;2010:967271.
19. Dridi B, Henry M, El Khéchine A, Raoult D, Drancourt M. High prevalence of Methanobrevibacter smithii and Methanosphaera stadtmanae detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. PLoS One 2009;4:e7063.
20. Klenk HP, Zillig W. DNA-dependent RNA polymerase subunit B as a tool for phylogenetic reconstructions: branching topology of the archaeal domain. J Mol Evol 1994;38:420-32.
21. Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, et al. Genomic and metabolic adaptations of Methanobrevibacter smithii to the human gut. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:10643-48.
22. Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. Annu Rev Med 2011;62:361-80.
23. Mathur R, Kim G, Morales W, Sung J, Rooks E, Pokkunuri V, et al. Intestinal Methanobrevibacter smithii but not total bacteria is related to diet-induced weight gain in rats. Obesity (Silver Spring) 2013;21:748-54.
24. Abell GC, Conlon MA, McOrist AL. Methanogenic archaea in adult human faecal samples are inversely related to butyrate concentration. Microb Ecol Health Dis 2006;18:154-60.
25. Sahakian AB, Jee M. Pimentel. Methane and the gastrointestinal tract. Dig Dis Sci 2010;55:2135-43.
26. Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcrA gene analysis. BMC microbiol 2008;8:79.
27. Lecours PB, Marsolais D, Cormier Y, Berberi M, Haché C, Bourdages R, et al. Increased prevalence of Methanosphaera stadtmanae in inflammatory bowel diseases. PloS one 2014;9:e87734.
28. Attaluri A, Jackson M, Valestin J, Rao SS. Methanogenic flora is associated with altered colonic transit but not stool characteristics in constipation without IBS. Am J Gastroenterol 2010;105:1407-11.

Archive of SID

www.SID.ir