مجله دنیای میکروب‌ها
سال پنجم، شماره اول و دوم (پیاپی ۱۲) تابستان ۱۳۹۱
صفحات ۲۹-۲۳

Original Article

جداسازی و شناسایی مولکولی *رودوباکتر اسفروئیدس* از استخر بی‌هوازی سیستم تصفیه فاضلاب

مجید مقبلی*[۱]، محمدرضا شفاعتی[۲]

[۱]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، [۲]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: *رودوباکتر* باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل و فتوتروفیک ارغوانی است که با اکسیداسیون سولفید هیدرژن به گوگرد قادر به حذف این ترکیب از محیط می‌باشد. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی *رودوباکتر* بود.

مواد و روش‌ها: به منظور جداسازی *رودوباکتر*، نمونه‌های پساب از استخر بی‌هوازی تصفیه خانه فاضلاب مهدی شهر جمع آوری و بر روی محیط فنیگ I کشت داده شدند. پس از استخراج DNA ژنومی از باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط یاد شده، از روش PCR به منظور تکثیر ژن 16S rRNA استفاده گردید. سپس محصول PCR تعیین توالی و به منظور شناسایی دقیق باکتری جداسازی شده، ترادف بازی آن BLAST گردید.

یافته‌ها: باکتری جداسازی شده از نظر ماکروسکوپی، بر روی محیط کشت اختصاصی کلنی قرمز ایجاد کرد و از نظر میکروسکوپی، میله‌ای گرم منفی بود. نتایج به دست آمده از مقایسه ترادف بازی 16S rRNA باکتری جداسازی شده نشان داد که این باکتری متعلق به جنس *رودوباکتر* است و شباهت ۹۹٪ به گونه *رودوباکتر اسفروئیدس* دارد.

نتیجه گیری: این مطالعه اولین گزارش جداسازی *رودوباکتر* در ایران می‌باشد. همچنین در این بررسی برای اولین بار یک سویه جدید از گونه *رودوباکتر اسفیروئیدس* از فاضلاب جداسازی و به عنوان سویه IRSMM1 در بانک جهانی ژن با شماره JX262384 ثبت گردید.

واژگان کلیدی: *رودوباکتر*، اکسیداسیون H2S، 16S rRNA

دریافت مقاله: فروردین ۱۳۹۱ پذیرش برای چاپ: خرداد ۱۳۹۱

مقدمه

باکتری‌های فتوتروف به طور گسترده‌ای در رده آلفا پروتئوباکترها قرار دارند. امروزه گونه‌های مختلفی از باکتری‌های فتوسنتز کننده را از محیط‌های مختلفی مانند آب شیرین، آب دریا، چشمه‌های آب گرم، یخ‌های قطب شمال و غیره جداسازی نموده‌اند (۱). فتوتروف‌های بی‌هوازی علاوه بر فتوسنتز، قادر به تنفس، تخمیر، متابولیسم کربن، گوگرد، نیتروژن و هیدروژن می‌باشند. همچنین نقش مهمی در ایجاد تعادل اکوسیستم‌ها و نیز حفاظت از محیط زیست ایفا می‌نمایند. به عنوان نمونه از باکتری‌های فتوسنتتیک اکسید کننده گوگرد می‌توان در تصفیه فاضلاب‌های خانگی و صنعتی استفاده نمود (۲). از اهمیت و فواید دیگر وجود این باکتری‌ها در

*)آدرس برای مکاتبه: دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۲۲۲۱۸۶۱۲ ، پست الکترونیک: moghbeli552@gmail.com

طبیعت، می‌توان به قابلیت آن‌ها در تولید موادی مانند ویتامین B_{12}، کو-آنزیم Q_{10}، ۵- آمینو والینیک اسید (ALA)، پورفیرین، هیدرژن و RNA اشاره نمود (۲ و ۳). همچنین از این ارگانیسم‌ها به دلیل تنوع در رنگدانه‌هایشان می‌توان در صنایع رنگرزی و نساجی نیز استفاده کرد. *رودوباکترها* (*Rhodobacter*) باکتری‌های گرم منفی، میله‌ای شکل، فتوتروفیک ارغوانی غیرگوگردی هستند که در شرایط مختلف مانند فتوسنتزی (بی‌هوازی) و لیتوتروفی (هوازی) قادر به رشد می‌باشند. باکتری *رودوباکتر کپسولاتوم* (*R. capsulatum*) به واسطه داشتن ژن *fqr* می‌تواند از سولفید هیدروژن به عنوان گیرنده الکترون استفاده و این ترکیب را به گوگرد اکسید نماید. همچنین گونه‌هایی از این جنس قادر به سم‌زدایی از تعدادی از اکسیدهای فلزی و اکسی آنیون‌ها می‌باشند (٤). در سال ۲۰۰۸ توانایی این باکتری در پاک‌سازی‌های بیولوژیک از جمله رسوب کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت (۵). امروزه مطالعات گسترده ژنتیکی و فیزیولوژیکی بر روی *رودوباکترها* به عنوان یک باکتری مدل مورد توجه می‌باشد. از این رو ژنوم باکتری *رودوباکتر کپسولاتوم* به طور کامل تعیین توالی شده است. همچنین *رودوباکتر اسفروئیدس* (*R. sphearoides*) اولین باکتری شناخته شده دارای چند کروموزوم می‌باشد (٦ و ۷). امروزه از این گونه در فرآیندهای مختلف بیوتکنولوژی مانند تولید هیدروژن زیستی، اندول، نانوذرات ZnS، رودیترین (Rhodethrin)و کاروتنوئید استفاده می‌گردد (۸-۱۱). با توجه به پتانسیل کاربردی *رودوباکتر* در حذف بوی ناشی از H_2S، این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی این باکتری انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه گیری: در این مطالعه از عمق ۲ متری برکه بی‌هوازی تصفیه خانه فاضلاب مهدی شهر دامغان استان سمنان، نمونه‌های پساب به وسیله دستگاه خاص نمونه گیری جمع آوری و با رعایت شرایط استریل بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

ب) محیط کشت و شرایط رشد: به منظور تهیه محیط کشت فنیگ I (Pfennig's Medium I)، ابتدا هر یک از محلول‌های ذکر شده در جدول ۱ تهیه گردید. سپس ml ٤۰۰۰ از محلول A، ۵ ml از محلول B، ۵ ml از محلول C، ۱۰۰ ml از محلول D و ۲۰ ml از محلول E با یکدیگر مخلوط گردید. به ترکیب حاصل، ۱۵ گرم در لیتر آگار اضافه و حجم آن با آب مقطر به ۵ لیتر رسانده شد. سپس محیط آماده شده در لوله‌های آزمایش به حجم‌های ۱۰ میلی لیتری تقسیم و به وسیله اتوکلاو استریل گردید.

به منظور آماده سازی نمونه‌ها برای کشت، ۵۰ میلی‌لیتر نمونه پساب به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب حاصله در ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل گردید. سپس قبل از سفت شدن محیط، کل حجم باکتری‌های حل شده به محیط تلقیح شد. به منظور ایجاد شرایط کاملاً بی‌هوازی، از دو روش اضافه کردن پارافین مایع استریل بر روی سطح محیط موجود در لوله و نیز روش به کارگیری پیروگالول و سود ۱۰٪ استفاده گردید (۱۲). در ادامه، لوله‌ها در دمای آزمایشگاه در معرض حدود ٤۰۰۰ لوکس نور قرار داده شدند. سپس از لوله‌های حاوی کدورت، بر روی محیط مذکور درون پلیت به صورت خطی کشت داده شد. در نهایت تمامی نمونه‌ها در جار بی‌هوازی به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۲).

جدول ۱: مواد لازم جهت تهیه محیط کشت فنیگ I.

محلول A: ترکیبات در ٤۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر					
KH_2PO_4	۱/۷ گرم	KCl	۱/۷ گرم	$CaCl_2{\cdot}2H_2O$	۱/۲۵ گرم
$CaCl_2{\cdot}2H_2O$	۱/۲۵ گرم	NH_4Cl	۱/۷ گرم	$MgSO_4$	۲/۵ گرم
محلول B: ترکیبات در ۸٦۰ میلی لیتر آب مقطر					
محلول ویتامین B_{12}	۰٪۰۰۲				
محلول C: ترکیبات در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر					
$Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$	۳٦ میلی گرم	H_3BO_3	۳۰۰ میلی گرم	$ZnCl_2$	۷۰ میلی گرم
$FeCl_2{\cdot}4H_2O$	۱/۵ گرم	$NiCl_2{\cdot}6H_2O$	۲٤ میلی گرم	$CoCl_2{\cdot}6H_2O$	۱۹۰ میلی گرم
HCl (25% solution)	۱۰ میلی لیتر	$MnCl_2{\cdot}4H_2O$	۱۰۰ میلی گرم	$CuCl_2{\cdot}2H_2O$	۲ میلی گرم
$KCl_2{\cdot}4H_2O$	۱/۵ گرم				
محلول D: ترکیبات در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر					
$Na_2S{\cdot}9H_2O$	۱۰ گرم	$NaHCO_3$	۷/۵ گرم		
محلول E: ترکیبات در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر					
$Na_2S.9H_2O$	۱۰ گرم				

ج) بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی‌های خالص: کلنی‌های خالص از نظر خواص ماکروسکوپی کلنی مانند رنگ، اندازه، شکل، حاشیه، برجستگی، ویژگی نوری، قوام و بو مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس با تهیه لام از هر نوع کلنی و رنگ آمیزی‌های گرم و اسپور، کلنی‌ها از نظر خواص میکروسکوپی نیز بررسی شدند.

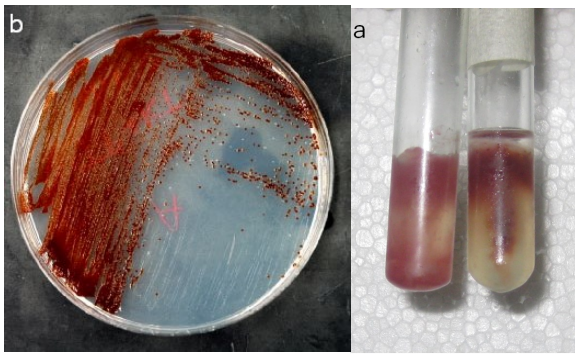
د) بررسی جذب H_2S و حرک باکتری‌ها: از آن‌جایی که این پژوهش با هدف جداسازی باکتری *رودوباکتر* اکسید کننده گوگرد و متحرک انجام گرفت، به منظور ارزیابی این دو ویژگی از محیط SIM استفاده شد (۱۲).

ه) استخراج DNA ژنومی و PCR: از روش Chen and Kuo با اندکی تغییر به منظور استخراج DNA استفاده گردید (۱۳). در ابتدا یک کلنی از باکتری مورد نظر به درون ۵ ml محیط کشت مایع اختصاصی تلقیح و به مدت ۵ روز در دمای آزمایشگاه در معرض نور قرار داده شد. پس از سانتریفوژ نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه، باکتری‌ها از محلول رویی جدا و در ۳۰۰ میکرولیتر محلول حاوی سوکروز، تریس، EDTA و RNAase حل شدند. در ادامه به سوسپانسیون سلولی حاصل، ۶۰۰ میکرولیتر محلول لیز کننده حاوی NaOH 1% و SDS 1% اضافه و مخلوط گردید. سپس عمل عصاره گیری از محلول سلول‌های لیز شده، یک بار با دو حجم فنل و بار دیگر با دو حجم کلروفرم انجام گرفت. به منظور رسوب DNA، دو حجم اتانل ۹۹٪ به محلول حاصل از عصاره گیری اضافه و مخلوط گردید. رسوب حاصله به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شده و با اتانل ۷۰٪ شستشو و در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. کمیت و کیفیت DNA جداسازی شده با بررسی میزان جذب در طول موج های ۲۶۰و ۲۸۰نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. از پرایمرهای CV16-F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و CV16-R 5'-TGGTGTGACGGGTGTGT-3' به منظور تکثیر ژن 16S rRNA استفاده گردید. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer (10X)، ۲ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰۰میکرومول dNTPs، ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز *Taq* (KBC Co.)، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر و ۱ میکرولیتر از نمونه DNA انجام گردید. سپس واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۴۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه BioDoc Analyze (Biometra) مورد بررسی قرار گرفت.

و) تعیین توالی: به منظور شناسایی کامل باکتری جداسازی شده، محصول PCR خالص شده به وسیله شرکت ماکروژن (کره جنوبی) تعیین توالی گردید. سپس توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار کروماس بررسی و پس از انجام تصحیحات لازم، در بانک جهانی ژن NCBI بلاست گردید. در نهایت با توجه به بلاست توالی به دست آمده و مقایسه آن با توالی‌های 16S rRNA موجود در بانک جهانی ژن، بیشترین شباهت‌ها بررسی و باکتری مورد نظر تا حد گونه شناسایی گردید.

نتایج

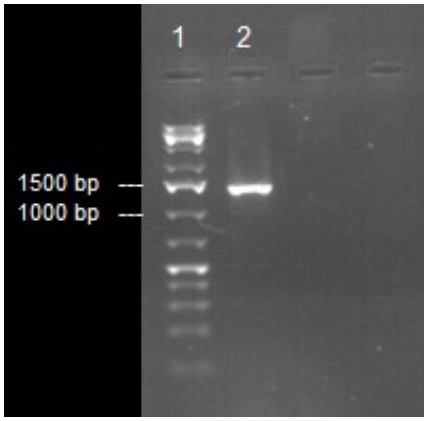
الف) ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی: پس از کشت نمونه پساب بر روی محیط اختصاصی فنیگ I، رشد مناسب



شکل ۱: مشخصات رشد و کلنی باکتری‌های رشد کرده بر روی محیط فنیگ I: a) لوله محیط کشت باکتری‌های فتوسنتتیک و اکسید کننده گوگرد، b) کلنی‌های مختلف رشد کرده بر روی پلیت.

باکتری‌های فتوسنتتیک اکسید کننده گوگرد با رنگدانه قرمز مشاهده گردید (شکل ۱–a). هر دو لوله دارای ترکیبی از باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت با قطر کمتر از یک میکرومتر، میله‌ای گرم منفی با کمی انحنا با قطر بیشتر از یک میکرومتر، میله‌ای گرم منفی و کوکوباسیل گرم منفی بودند. پس از کشت هر لوله بر روی محیط اختصاصی، ۳ نوع کلنی مختلف با مشخصات زیر ایجاد گردید (شکل ۱–b): کلنی شماره ۱: سفید مایل به شیری، قطر حدود ۷ میلی متر، مات، کناره‌های صاف و سطح صاف، کلنی شماره ۲: قرمز رنگ، قطر حدود ۳ میلی متر، سطح محدب، نیمه شفاف و کناره‌های صاف و کلنی شماره ۳: شیری، قطر حدود ۳ میلی متر، شفاف، سطح صاف و کناره های صاف داشتند. نتایج به دست آمده از کشت خالص و رنگ آمیزی‌های گرم و اسپور نشان داد که کلنی شماره ۱ از باکتری‌های میله‌ای، گرم مثبت، با قطر کم‌تر از یک میکرومتر و طول حدود ۳–۲ میکرومتر با دو انتهای گرد تشکیل شده و دارای اسپور بیضی شکل نزدیک به انتها می‌باشد. کلنی شماره ۲ در بردارنده باکتری‌های میله‌ای، کمی خمیده، گرم منفی، با قطر بیش از یک میکرومتر و فاقد اسپور بود. کلنی شماره ۳ نیز حاوی باسیل‌های گرم منفی بود. هر ۳ کلنی از نظر اکسیداسیون H_2S مثبت گزارش شدند. اما تنها کلنی‌های ۲ و ۳ متحرک بودند.

ب) ارزیابی کمی و کیفی DNA کروموزومی: در این مطالعه



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR. ۱) مارکر (1kb)، ۲) قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA.

جذب رقت یک به صد نمونه DNA کروموزومی در طول موج ۲۶۰ برابر ۰/۱۵۳، در طول موج ۲۸۰ برابر ۰/۰۸ و نسبت این دو جذب برابر ۱/۹۲ گزارش گردید. از آن‌جایی که این نسبت بیش از ۱/۸ می‌باشد، این DNA از نظر کیفی برای انجام PCR مناسب بود. با توجه به این‌که هر OD ۱ جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر معادل ۵۰ میکروگرم DNA در میلی لیتر می‌باشد، غلظت نمونه‌ها به شرح زیر محاسبه گردید:

۰/۱۵۳ × ۱۰۰ = ۱۵/۳

۱۵/۳ × ۵۰= ۷۵۰/۶ µg DNA /ml = ۶/۷۵۰ng/µl

د) PCR: نتایج PCR ژن 16S rRNA، تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی را نشان داد (شکل ۲).

ج) تعیین توالی محصول PCR: نتایج به دست آمده از آنالیز و بلاست توالی 16S rRNA باکتری جدا شده نشان داد که این باکتری متعلق به جنس *رودوباکتر*است و دارای شباهت ۹۹٪ به گونه *اسفروئیدس* می‌باشد. بنابراین با توجه به عدم شباهت ۱۰۰٪، باکتری جداسازی شده سویه جدید معرفی گردید. این باکتری به عنوان *رودوباکتر اسفروئیدس* سویه IRSMM1 نام گذاری و در بانک جهانی ژن با شماره JX262384 ثبت شد.

بحث

تابش نور خورشید به آب‌های راکدی که در اثر تجزیه سریع مواد آلی در آن‌ها سولفید تولید می‌شود، موجب ایجاد شرایط مساعد رشد باکتری‌های فتوتروفیک بی‌هوازی می‌گردد. این باکتری‌ها اغلب با فراوانی بالا در این نوع محیط‌ها وجود دارند و به رنگ‌های صورتی، قرمز، قهوه‌ای یا سبز دیده می‌شوند (۱۴). تنوع متابولیک باکتری‌های ارغوانی، به ویژه باکتری‌های ارغوانی غیرگوگردی، موجب شده که این باکتری‌ها بتوانند در محدوده وسیعی از شرایط محیطی رشد نمایند (۱). در پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران، به منظور جداسازی *رودوباکتر اسفروئیدس* از نمونه‌های فاضلاب استخر بی‌هوازی استفاده گردید. در حالی‌که در مطالعات مختلف *رودوباکترها* از نمونه‌های خاک، گل، لجن و آب‌های غنی از مواد آلی

جداسازی شده‌اند (۹-۱۱). از طرفی در بررسی‌های انجام شده به منظور شناسایی *رودوباکترها* از محیط‌های اختصاصی مانند RM2 و MMYS II استفاده شده است (۱۵). اما در این مطالعه از محیط کشت فنیگ I (محیطی عمومی جهت رشد باکتری‌های فتوتروفیک بی‌هوازی) استفاده گردید. به طوری که باکتری رشد کرده بر روی این محیط به صورت گرم منفی، میله‌ای، متحرک، فاقد اسپور و دارای کلنی‌های قرمز رنگ گزارش گردید. در بسیاری از مطالعات میزان دسترسی به نور و فشار اکسیژن محلول (DO) به عنوان فاکتورهای اصلی موثر در رشد و قابلیت زیست باکتری‌های فتوتروفیک بی‌هوازی مورد بررسی قرار گرفته است. به طوری که نتایج نشان می‌دهد گونه‌های *رودوباکترها* در سطوح بالای BOD غالب‌تر می‌باشند (۱۶). این یافته در مطالعه حاضر نیز به اثبات رسید. زیرا استخر بی‌هوازی از میزان اکسیژن کم‌تر، میزان نور و BOD بالایی برخوردار است و با توجه به استفاده از محیط‌های عمومی رشد باکتری‌های بی‌هوازی فتوسنتز کننده، تنها گونه *رودوباکتر اسفیروئیدس* توانایی رشد در این شرایط را داشت. در این مطالعه به منظور جداسازی DNA باکتریایی از یک روش عمومی بهینه سازی شده استفاده گردید. از آن‌جایی که نمونه DNA به دست آمده دارای کمیت و کیفیت مناسبی بوده نشان می‌دهد که برای استخراج DNA ژنومی از *رودوباکترها* نیاز به روش‌های خاص و یا استفاده از کیت نمی‌باشد. در این پژوهش برای شناسایی دقیق باکتری‌های جداسازی شده از روش تعیین توالی ژن 16S rRNA استفاده گردید. نتایج به دست آمده از آنالیز و بلاست توالی 16S rRNA نشان داد که این باکتری دارای شباهت ۹۹٪ به گونه *رودوباکتر اسفیروئیدس* می‌باشد. مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نیز تایید کننده نوع گونه می‌باشد.

نتیجه گیری

در این مطالعه یک سویه جدید از گونه *رودوباکتر اسفیروئیدس* از استخر بی‌هوازی تصفیه پساب جداسازی و به عنوان سویه IRSMM1 در بانک ژن با شماره JX262384 ثبت گردید. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان گفت به منظور تولید فرآورده‌های مختلف مانند هیدروژن زیستی و یا در راستای حذف H_2S و بوی بد ناشی از آن در فاضلاب می‌توان از *رودوباکترها* به عنوان یک گزینه مناسب استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون محترم پژوهشی و پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی دامغان به دلیل همکاری اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Imhoff JF. Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. Anoxy photosyn bacteriol 2004: 1-15. DOI:10.1007/0-306-47954-0_1.
2. Sasaki K, Watanabe M, Suda Y, Ishizuka A, Noparatnaraporn N. Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. J biosci bioeng. 2005; 100(5): 481-488.
3. Amiri S. Influence of biological ingredient on variation of Photosynthetic Bacteria. M.S. thesis, Tehran, faculty of science, Islamic Azad University,Tehran north branch, 2008 [In Persian].
4. Croal LR, Jiao Y, Newman DK. The fox operon from *Rhodobacter* strain SW2 promotes phototrophic Fe (II) oxidation in *Rhodobacter capsulatus* SB1003. J Bacteriol. 2007;189(5): 1774-8172.
5. Bai H-J, Zhang Z-M, Gong J. Biological synthesis of semiconductor zinc sulfide nanoparticles by immobilized *Rhodobacter sphaeroides*. Biotechnol lett. 2006; 28(14): 1135-1139.
6. Suwanto A, Yuhana M, Herawaty E, Angka S. Genetic diversity of luminous Vibrio isolated

from shrimp larvae. Advances in shrimp biotechnology National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand. 1998: 217-224.

7. Kaplan HI, Sadock BJ. Synopsis of psychiatry: Behavioral sciences. Clin psychiatry. 1998; 8: 534-558.

8. Poulain AJ, Newman DK. *Rhodobacter capsulatus* catalyzes light-dependent Fe (II) oxidation under anaerobic conditions as a potential detoxification mechanism. App Env Microbiol. 2009; 75(21): 6639-6646.

9. Mackenzie C, Eraso JM, Choudhary M, Roh JH, Zeng X, Bruscella P, Puskás A, Kaplan S. Postgenomic Adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. Annu Rev Microbiol. 2007; 61: 283-307.

10. Yen HW, Chiu CH. The influences of aerobic-dark and anaerobic-light cultivation of *Rhodobacter sphaeroides* in the submerged fermenter. Enz microbial technolo. 2007; 41(5): 600-604.

11. Zhu H, Fang HH, Zhang T, Beaudette LA. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. Int J Hydrogen Energy. 2007; 32(17): 4112-4118.

12. Soto-Feliciano K, De Jesús M, Vega-Sepúlveda J, Ríos-Velázquez C. Isolation and characterization of purple non-sulfur anoxyphototropic bacteria from two microecosystems: tropical hypersaline microbial mats and bromeliads phytotelmata. A. Méndez-Vilas . Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology . formatex. 2010. 109-116.

13. Chen W, Kuo T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucl Acid Res. 1993; 21(9): 2260.

14. Pfennig N, Triiper H. Nomenclature of bacterial chlorophylls designation. CRC handbook of microbiology. 1977; 1: 119.

15. Hiraishi A, Ueda Y. Isolation and characterization of *Rhodovulum strictum* sp. nov. and some other purple nonsulfur bacteria from colored blooms in tidal and seawater pools. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45(2): 319-326.

16. Okubo Y, Futamata H, Hiraishi A. Distribution and capacity for utilization of lower fatty acids of phototrophic purple nonsulfur bacteria in wastewater environments. Microb Env. 2005; 20 (3): 135-43.

Journal of Microbial World
Volume 5, No. 1&2, June 2012

Original Article

Isolation and molecular identification of *Rhodobacter sphaeroides* from anaerobic lagoon of wastewater treatment system

Majid Moghbeli[1] , **Mohammad Reza Shafaati**[2]

[1] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
[2] MSc, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Rhodobacter* is a gram negative rod shaped purple phototrophic bacteria capable of oxidizing H_2S to S and thus capable of elimination of H_2S from nature. This project aimed to isolate and identify *Rhodobacter sphaeroides* from nature.

Material and Methods: The water samples were collected from anaerobic lagoon wastewater of Mahdi-shahr wastewater treatment plant. The samples then were cultured on Pfennig'S Medium I. After growing the bacteria, the colonies were investigated based on 16S rRNA gene amplification. Finally, the PCR products were sequenced and were investigated by BLAST to determine the phylogenetic of the isolated bacteria.

Results: Macroscopic studies on the isolated red colonies showed gram negative bacilli. Based on the 16S rRNA sequence studies, this bacterium belonged *Rhodobacter* and had 99% similarity to *Rhodobacter sphaeroides*.

Conclusion: Fist time in Iran, *Rhodobacter sphaeroides* was isolated. Also, this study could isolate a new strain of *Rhodobacter sphaeroides* was isolated from waste water and was registered in gene bank with IRSMM1 name and JX262384 acceptation number.

Keywords: *Rhodobacter*, H_2S Oxidation, 16S rRNA

Correspondance to: Majid Moghbeli
Tel: +989122218612
E-mail: moghbeli552@gmail.com
Journal of Microbial World 2012, 5(1&2): 23-29.