فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۱۲۹- ۱۳۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۲۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۳۱

جداسازی و شناسایی مولکولی *کلستریدیوم بای فرمانتانس* از برکه‌های بی‌هوازی تصفیه‌خانه فاضلاب

مجید مقبلی *: استادیار میکروبیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران، moghbeli552@gmail.com
محمدرضا شفاعتی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران، mohammadreza.shafaati@gmail.com

چکیده

مقدمه: *کلستردیوم بای فرمانتانس* (*Clostridium bifermentans*) یک باکتری غیر بیماری‌زاست که نخستین بار توسط تیسیر و مارتلی در سال ۱۹۹۲ جداسازی شد. این باکتری به لحاظ تاکسونومی رابطه خیلی نزدیکی با *کلستردیوم سوردیلی* دارد و قادر به تولید طیف وسیعی از متابولیت‌ها مانند اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید فرمیک، اتانول، بوتانول، استن، کربن‌دی‌اکسید، نیتروژن و به ویژه هیدروژن به عنوان یک منبع انرژی پاک است. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی مولکولی *کلستردیوم بای فرمانتانس* است.

مواد و روش‌ها: برای جداسازی *کلستردیوم بای فرمانتانس*، نمونه پساب از استخر بی‌هوازی تصفیه خانه فاضلاب مهدی‌شهر بر روی یک محیط سنتزیکمپلکس کشت داده شده و دردمای محیط وتحت شرایط بی‌هوازی قرار داده شد. از باکتری‌های رشد کرده DNA کروموزومی جداسازی و با کمک پرایمرهای اختصاصی، ژن *16S rRNA* آن PCR شد. محصول PCR تخلیص و تعیین ترادف بازی شد. در نهایت، برای شناسایی دقیق باکتری جدا شده، ترادف بازی BLAST شد.

نتایج: باکتری جدا شده از نظر ماکروسکوپی بر روی یک محیط کمپلکس کلونی سفید ایجاد کرد و از نظر میکروسکوپی گرم مثبت میله‌ای شکل و اسپردار بود. نتیجه بررسی تعیین ترادف بازی ژن *16S rRNA* نشان داد که باکتری جدا شده به گونه *کلستریدیوم با ی فرمانتانس* متعلق است که در بانک ژن جهانی با نام سویه IRI2 و شماره KC525132 ثبت شد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این پژوهش سویه‌ای از *کلستردیوم بای فرمانتانس* جداسازی، شناسایی فیزیولوژیک و مقایسه مولکولی *16S rRNA* شد. با توجه به توانایی این باکتری در تولید فرآورده‌های مختلف صنعتی، از این باکتری می‌توان در تولید هیدروژن به عنوان یک بیوگاز استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: *کلستردیوم بای فرمانتانس*، فاضلاب، شناسایی، *16S rRNA*

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

کلستردیوم بای فرمانتانس باکتری گرم مثبت بی‌هوازی و دارای تحرک است که نخستین بار توسط تیسیر و مارتلی در سال ۱۹۹۲ جداسازی شد. این ارگانیسم به لحاظ تاکسونومی رابطه خیلی نزدیکی با *کلستردیوم سوردیلی* دارد (۱). در اواخر سال ۱۹۶۲ این گونه به عنوان گونه‌ای جدید از جنس *کلستردیوم* مشخص شد (۲ و ۳). *کلستردیوم سوردیلی* به عنوان یک باکتری بیماری‌زا و *کلستردیوم بای‌فرمانتانس* به عنوان یک باکتری غیر بیماری‌زا مشخص شده‌اند (۴). علاوه بر این، این دو باکتری می‌توانند بر اساس تولید اوره نیز از هم متمایز شوند (۳). منبع اصلی این باکتری آب، خاک، فاضلاب، لجن و مدفوع حیوانات است (۵). این باکتری قادر به تولید طیف وسیعی از متابولیت‌ها مانند اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید فرمیک (۶)، اتانول، بوتانول، استن (۷)، کربن دی اکسید، هیدروژن و نیتروژن (۳ و ۸) است. با این حال تا کنون جزئیات بیشتری درباره مسیرهای متابولیکی این باکتری مشخص نشده است. از بارزترین متابولیت‌های این باکتری می‌توان به هیدروژن اشاره کرد. هیدروژن به عنوان یک منبع انرژی پاک است. تبدیل بی‌هوازی توده‌های زیستی یکی از راه‌های دسترسی به این انرژی است. بسترهای مورد استفاده برای تولید هیدروژن عبارتند از: لجن فعال (۹- ۱۱)، زباله (۱۱ و ۱۲)، ملاس نیشکر (۱۳). شیوه‌های متفاوتی تا کنون برای تولید هیدروژن گزارش شده است که یکی از این روش‌ها تولید متان و سولفید هیدروژن در طی فرایند بی هوازی و سپس، تبدیل آن‌ها به هیدروژن است (۱۳ و ۱۴).

تولید مناسب هیدروژن در یک راکتور بی‌هوازی بستگی به روش‌های ویژه‌ای برای جلوگیری از شرکت متابولیت‌های ثانویه در طول واکنش دارد (۱۵). بخش کمی از هیدروژن تولید شده در فاز گازی توسط باکتری‌های اسیدوژنیک و متاژنیک است (۱۱، ۱۶ و ۱۷). لجن فعال موجود در سیستم‌های تصفیه فاضلاب حاوی مواد آلی زیادی است در نتیجه یک بستر بالقوه برای تولید هیدروژن به حساب می‌آید. استفاده از سویه *کلستردیوم* به ویژه *کلستریدیوم بای فرمانتانس* برای تولید بیوهیدروژن، دارای بیش‌ترین راندمان و کم‌ترین هزینه است (۱۸- ۲۰). هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی مولکولی *کلستردیوم بای فرمانتانس* است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: نمونه پساب از برکه بی‌هوازی تصفیه خانه فاضلاب مهدی‌شهر واقع در استان سمنان به وسیله نمونه‌گیر خاص از عمق حدود ۲ متر تهیه شد و در ظروف شیشه‌ای استریل در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

محیط کشت و شرایط رشد: برای تهیه محیط کشت ابتدا محلول‌های یاد شده در جدول ۱ (۲۱ و ۲۲) تهیه و سپس، ۴۰۰۰ میلی‌لیتر ازمحلول A، ۵ میلی‌لیتر از محلول B، ۵ میلی‌لیتر از محلول C، ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول D و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول E را با هم مخلوط کرده، میزان ۱۵ گرم در لیتر به آن آگار اضافه کرده و حجم آن با آب مقطر به ۵ لیتر رسانده شد. محیط آماده شده در لوله آزمایش به حجم ۱۰ میلی‌لیتر تقسیم و توسط اتوکلاو استریل شد.

برای آماده‌سازی نمونه برای کشت، ۵۰ میلی‌لیتر نمونه پساب در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب به دست آمده در ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون شد و سپس، قبل از

این‌که محیط سرد شده و ببندد، کل حجم باکتری‌های سوسپانسیون شده به محیط تلقیح شد. برای ایجاد شرایط بی‌هوازی کامل، از دو روش اضافه کردن پارافین مایع استریل بر روی سطح محیط در درون لوله و روش به‌کار بردن پیروگالول و سود ۱۰ درصد استفاده شد. بعد از این که باکتری بر روی سطح شیب‌دار محیط کشت داده شد، یک در پوش پنبه‌ای درون لوله قرار داده و دقیقا تا بالای سطح شیب دار محیط انتقال داده شد. سپس، فضای بین در پوش پنبه‌ای تا سرلوله با کریستال‌های پیروگالول پر شده و ۱ میلی‌لیتر NaOH ۱۰ درصد به آن اضافه شد. درب لوله با درپوش پلاستیکی محکم بسته، لوله سریع بر عکس شده و نمونه‌ها مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۲۳). سپس، از لوله‌های حاوی کدورت بر روی محیط یاد شده درون پلیت به شکل خطی کشت داده و در جار بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد.

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلونی‌های خالص: کلونی‌های خالص از نظر خواص ماکروسکوپی (شکل ظاهری کلونی) نظیر رنگ، اندازه، شکل، مشخصات کناره کلونی، برجستگی، ویژگی نوری، بوی کلونی و قوام کلونی و سپس از نظر خواص میکروسکپی با تهیه لام از هر نوع کلونی و رنگ آمیزی گرم و اسپر طبق روش‌های متداول آزمایشگاه میکروبیولوژی بررسی شدند.

بررسی باکتری‌های جدا شده: با توجه به این‌که هدف انجام این پژوهش جداسازی باکتری *کلستردیوم بای فرمانتانس* است، آزمون‌های بیوشیمیایی مربوطه بر اساس باکتری‌شناسی برجی (۲۴) با انتخاب یک کلونی خالص از باکتری‌های جدا شده انجام شد. بعد از اطمینان از این که باکتری جدا شده یک باسیل گرم مثبت اسپردار بی هوازی مطلق است، از آزمون اوره‌آز و آمین به عنوان آزمون شاخص برای تمایز بین گونه‌های مختلف این باکتری استفاده شد (۲۵).

جدول ۱- مواد لازم برای تهیه محیط کشت (۲۱ و ۲۲)

محلول A		محلول B		محلول C		محلول D		محلول E	
۱/۲۵ گرم	$CaCl_2 \times 2H_2O$	٪۰/۰۰۲	محلول ویتامین B12	۳ گرم	Na_2EDTA	۷/۵۰ گرم	$NaHCO_3$	۱۰ گرم	$Na_2S.\ 9H_2O$
۱/۷۰ گرم	KH_2PO_4			۱/۱۰ گرم	$FeSO_4.\ 7H2O$	۱۰۰ میلی‌لیتر	آب مقطر	۱۰۰ میلی‌لیتر	آب مقطر
۱/۷۰ گرم	NH_4Cl			۱۹۰ میلی‌گرم	$CoCl_2.\ 6H_2O$				
۱/۷۰ گرم	KCl			۴۲ میلی‌گرم	$ZnCl_2$				
۲/۵۰ گرم	$MgSO_4$			۲۴ میلی‌گرم	$NiCl_2.\ 6H_2O$				
۴۰۰۰ میلی‌لیتر	آب مقطر			۱۸ میلی‌گرم	$Na_2MoO_4.\ 2H_2O$				
				۳۰۰ میلی‌گرم	H_3BO_3				
				۲ میلی‌گرم	$CuCl_2.\ 2H_2O$				
				۱۰۰۰ میلی‌لیتر	آب مقطر				

جداسازی DNA ژنومی و شرایط PCR: جداسازی DNA ژنومی باکتری طبق روش چن[1] و همکاران (۲۶) با تغییراتی به این شرح انجام شد. یک کلونی از باکتری مورد نظر در داخل ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تلقیح و به شکل بی‌هوازی به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کدورت مناسب از باکتری ایجاد شود. باکتری‌ها به‌وسیله سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳ دقیقه از محلول رویی جدا شده و در ۳۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۱ (سوکروز ۱۵درصد، تریس ۰/۰۴ مولار، EDTA ۰/۰۰۲ مولار، لیزوزیم ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و RNAase ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) سوسپانسیون شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده تا آنزیم لیزوزیم دیواره پپتیدوگلیکانی را تجزیه کند. به سوسپانسیون سلولی ۶۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۲ (NaOH یک درصد و SDS یک درصد) اضافه و به آرامی هم زده شد تا سلول‌ها کاملا لیز شوند سپس سلول‌های لیز شده یک بار با دو حجم فنل و یک بار با دو حجم کلروفرم عصاره‌گیری شد. برای رسوب دادن DNA دو حجم اتانل ۹۹ درصد اضافه و به آرامی هم زده شد تا رسوب DNA تشکیل شود. رسوب با سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جدا شده و با اتانل ۷۰ درصد شستشو شد و بعد از خشک شدن آن، در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد.

کمیت و کیفیت DNA ژنومی جدا شده با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ بررسی شد. ژن *16S rRNA* به‌وسیله PCR با استفاده از پرایمرهای زیر تکثیر شد.

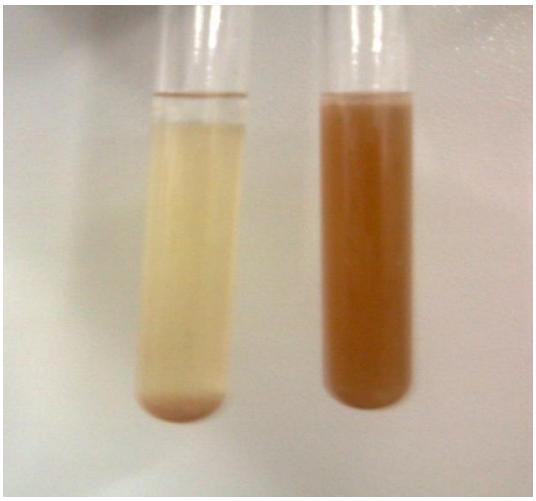
EC16-F 5'gTT-TgA-TCC-Tgg-CTC-A-<g>-3'
EC16-R5'–TAC-CTT-gTT-ACg-ACT-TC-<A>-3'

هر ۲۵ میکرولیتر واکنش PCR حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر10X، انواع dNTP (شرکت کوثر، ایران) با غلظت نهایی ۲۰۰ میکرو مولار، پرایمرها هر کدام با غلظت ۰/۲ میکرو مولار، $MgCl_2$ با غلظت ۲ میلی‌مولار و آنزیم *Taq* DNA Polymerase (شرکت کوثر، ایران) با غلظت ۱ واحد و ۱ میکرو لیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو است. این واکنش با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۴۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت یک دقیقه و در نهایت، ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای گسترش نهایی انجام شد. قطعه تکثیر یافته با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ارزیابی شد.

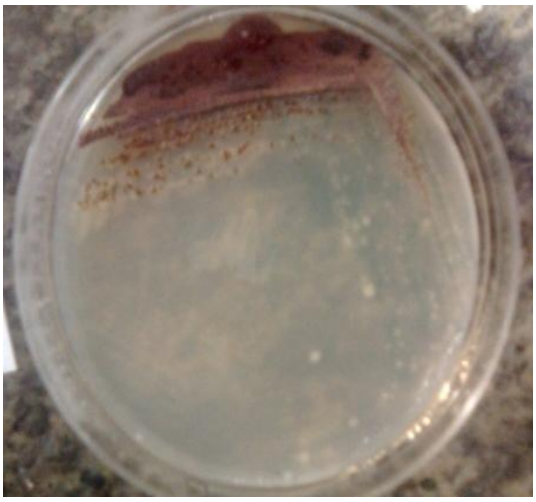
تعیین ترادف بازی[2] و تحلیل آن: برای شناسایی کامل باکتری جدا شده، محصول PCR خالص شده توسط شرکت کره‌ای ماکروژن تعیین ترادف بازی شد. ترادف بازی به دست آمده با نرم افزار کروماس بررسی و سپس بعد از تصحیح‌های مورد نیاز، در بانک ژن جهانی (NCBI) بلاست شد. با توجه به بلاست ترادف موجود با سکانس‌های *16S rRNA* موجود در بانک ژن جهانی، بیش‌ترین شباهت‌ها بررسی و در نهایت باکتری مورد نظر تا حد گونه شناسایی شد.

نتایج

ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی باکتری‌های جدا شده: از کشت نمونه پساب در محیط کشت کمپلکس، رشد مناسبی حاصل شد (شکل ۱). از لوله‌ها به طور جداگانه نمونه برداشت کرده و رنگ آمیزی گرم انجام شد. هر دو لوله دارای مخلوطی از باکتری‌ها به شکل میله‌ای گرم مثبت با قطر کمتر از یک میکرو متر، میله‌ای گرم منفی با کمی انحنا با قطر بیشتر از یک میکرومتر، میله‌ای گرم منفی و کوکوباسیل گرم منفی، بودند. در این پروژه هدف جداسازی باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت است بنابراین، از هر لوله بر روی پلیت محیط کشت کمپلکس به شکل خطی کشت داده شد که ۳ نوع کلونی مختلف (شکل ۲) با ویژگی‌های زیر ایجاد شد؛کلونی شماره ۱: سفید مایل به شیری، قطر حدود ۷ میلی‌متر، مات، کناره‌ها صاف، سطح صاف. کلونی شماره ۲: قرمز رنگ، قطر حدود ۳ میلی‌متر، سطح محدب، نیمه شفاف، کناره‌ها صاف، کلونی شماره ۳: شیری، قطر حدود ۳ میلی‌متر، شفاف، سطح صاف، کناره‌ها صاف. از کشت خالص و رنگ آمیزی گرم و اسپور مشخص شد کلونی شماره ۱ از باکتری‌های میله‌ای شکل گرم مثبت با قطر یک میکرو متر و طول حدود ۲ تا ۳ میکرومتر با دو انتهای گرد تشکیل شده است و دارای اسپور بیضی شکل نزدیک به انتهاست. کلونی شماره ۲ از باکتری‌های میله‌ای شکل کمی خمیده گرم منفی با قطر بیش از یک میکرومتر و فاقد اسپر است. کلونی شماره ۳ باسیل گرم منفی است. هر ۳ کلونی از نظر اکسیداسیون H_2S مثبت بوده و کلونی‌های ۱ و۳ متحرک بودند.



شکل ۱- رشد نمونه‌ها در محیط کشت



شکل ۲- کلونی‌های مختلف رشد کرده بر روی پلیت

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی: با توجه به جدول ویژگی‌های بیوشیمیایی جنس *کلستریدیوم* در کتاب برجی و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری گرم مثبت اسپردار (جدول ۲)، این باکتری متعلق به گونه *کلستریدیوم بای فرمانتانس* است.

جدول۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده، برای شناسایی باکتری

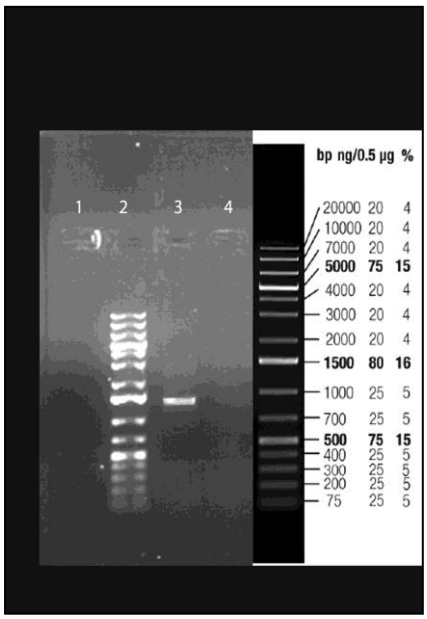
لسیتیناز	TSI	SIM	مانوز	فروکتوز	اوره	نیرات	لیپاز	لاکتوز	مانیتول	مانوز
+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–

شکل ۳- الکتروفورز DNA ژنومی باکتری

جداسازی DNA ژنومی: نتیجه الکتروفورز DNA ژنومی جدا شده در شکل ۳ آمده است و همین‌طور که در شکل مشخص است نمونه جدا شده دارای باند شارپ و خالص است.

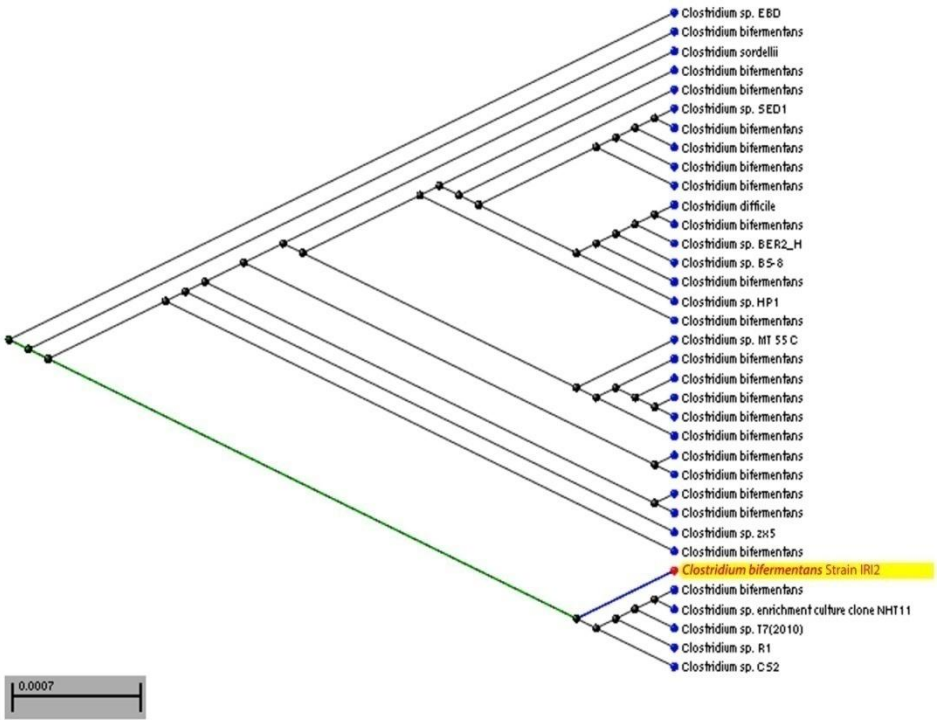
بررسی کمی و کیفی DNA کروموزومی جدا شده: جذب رقت یک به صد نمونه در طول موج ۲۶۰ برابر ۰/۱۱۲ و در طول موج ۲۸۰ برابر ۰/۰۶۴ است. نسبت این دو جذب برابر ۱/۷۵ است؛ بنابراین، این DNA از نظر کیفی برای PCR مناسب است. با توجه به این‌که هر OD ۱ جذب در طول موج ۲۶۰ برابر با ۵۰ میکروگرم DNA در میلی‌لیتر است، غلظت نمونه جدا شده ۵۶۰ نانوگرم در میکرولیتر می‌باشد.

اختصاصیت PCR: الکتروفورز ۵ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نشانگر kb[۳]۱ (فرمنتاس) بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مطابق انتظار یک باند اختصاصی حدود ۱۵۰۰ جفت باز حاصل شد (شکل ۴).



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR. لاین ۱: کنترل منفی، لاین ۲: مارکر، لاین۳: محصول PCR

نتایج تعیین ترادف محصول PCR: نتیجه تحلیل و بلاست ترادف *16S rRNA* نشان داد که این باکتری به جنس *کلستریدیوم* متعلق بوده و ۹۹ درصد شباهت به گونه *بای فرمانتانس* دارد. با توجه به عدم شباهت ۱۰۰ درصد، باکتری جدا شده سویه جدیدی است و *کلستریدیوم بای فرمانتانس* سویه *IRI2* نام گذاری و در بانک ژن جهانی با شماره KC525132 ثبت شد. درخت فیلوژنتیکی به دست آمده براساس ژن *16S rRNA* (شکل۵) نشان می‌دهد که این سویه با توجه به عدم شباهت ۱۰۰ درصد در شاخه جداگانه قرار دارد، که با توجه به قرار گرفتن آن بعد از *کلستردیوم دیفیسیل* و *کلستردیوم سوردیلی*سویه جدیدی از جنس *کلستردیوم* است.



شکل۵- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده برای *کلستردیوم بای‌فرمانتانس* و قرارگیری آن در شاخه‌ای جدا گانه که دلالت بر سویه‌ای جدید دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

آب‌های راکد و سیستم‌های تصفیه فاضلاب به علت غنی بودن از مواد آلی باعث ایجاد شرایط مساعد رشد برای طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله شیمیوارگانوتروف‌های بی‌هوازی می‌شود. جنس *کلستردیوم* در این میان دارای وسیع‌ترین طیف است. تنوع متابولیکی این جنس سبب شده تا این باکتری ساپروفیت، نقش اصلی در تخریب مواد آلی در طبیعت داشته باشد (۲۷). باکتری‌های متعلق به جنس *کلستردیوم* از منابع مختلف از جمله: خاک، کود، فاضلاب و آب‌های راکد، روده انسان و حیوانات جدا شده‌اند (۲، ۵، ۲۸ و ۲۹). با توجه به این‌که استخرهای بی هوازی تصفیه فاضلاب دارای شرایط بی‌هوازی و مقادیر بالایی مواد آلی هستند، در این مطالعه برای جداسازی *کلستریدیوم بای فرمانتانس*از نمونه فاضلاب استخرهای بی‌هوازی مهدی‌شهر استان سمنان استفاده شد. در مطالعات مختلف از محیط‌های اختصاصی نظیر PCE، PYG، PYC، M63 و CM برای جداسازی استفاده شده است (۱۴، ۲۱ و ۲۹). ولی در این مطالعه از یک محیط کمپلکس استفاده شد. بر روی این محیط یک باکتری شیمیوارگانوتروف بی‌هوازی، گرم مثبت، میله‌ای شکل متحرک و دارای اسپور جدا شد و با استفاده از روش *16S rRNA* مشخص شد با ۹۹ درصد شباهت به گونه *کلستریدیوم بای فرمانتانس* متعلق است. ویژگی‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی نیز تایید کننده این نتیجه بود. این نخستین مطالعه در نوع خود در داخل کشور، در خصوص جداسازی این باکتری از سیستم تصفیه فاضلاب است. این باکتری در کشورهایی نظیر بریتانیا، ایالات متحده امریکا، آمریکای جنوبی، استرالیا و روسیه جداسازی شده است (۲۹). در بسیاری از مطالعات نبود اکسیژن و وجود مواد آلی، عامل‌های اصلی رشد برای این باکتری

شیمیوارگانوتروف شمرده شده است (۵). در این مطالعه نیز این مطلب تأیید شد، زیرا در عمق پایین استخرهای بی‌هوازی تصفیه فاضلاب از میزان اکسیژن خیلی کم و مواد آلی بالا برخوردار است. در این مطالعه یک سویه جدید از گونه *کلستریدیوم بای فرمانتانس* از استخرهای بی‌هوازی تصفیه فاضلاب جدا و به عنوان یک سویه جدید در بانک ژن جهانی به شماره دسترسی KC525132 ثبت شد؛ که نخستین پژوهش در خصوص جداسازی این گونه در ایران است. با توجه به توانایی این باکتری در تولید محصولات صنعتی مختلف نظیر: اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید فرمیک، اتانول، بوتانول، استن، کربن دی اکسید، هیدروژن و نیتروژن، در مطالعات بعدی می‌توان از آن برای تولید این فرآورده‌ها به ویژه تولید بیوهیدروژن استفاده کرد.

References

(1) Burkholder W., Breed RS., Murray EGD., Smith, NR. Genus Xanthomonas, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 7th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co.; 1957.

(2) Brooks ME., Epps H. Taxonomic studies of the genus *Clostridium*: *Clostridium bifermentans* and *C. sordellii*. *Journal of general microbiology* 1959; 21 (1): 144- 55.

(3) Leja K., Myszka K., Czaczyk K. The ability of *Clostridium bifermentans* strains to lactic acid biosynthesis in various environmental conditions. *Springer Plus*. 2013; 2 (1): 1- 8.

(4) Cabral JP. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research Public Health* 2010;7 (10): 3657- 703.

(5) Wang C., Chang C., Chu C., Lee D., Chang B-V., Liao C. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Journal of Biotechnology* 2003; 102 (1): 83- 92.

(6) Zhang Y. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for production of biofuels and bio-based chemicals: *Chemical Molecular Engineering* 2009; 2 (4) , 373- 382.

(7) Alalayah W., Kalil M., Kadhum A., Jahim J., Zaharim A., Alauj N., et al. Applications of the Box-Wilson Design Model for Bio-hydrogen Production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum N 1-4* (ATCC 13564). *Pakistan Journal of Biological Science* 2010; 13 (14): 674- 82.

(8) Brooks J., Moss C., Dowell V. Differentiation between *Clostridium sordellii* and *Clostridium bifermentans* by gas chromatography. *Journal of bacteriology* 1969; 100 (1): 528- 30.

(9) Sawayama S., Rao KK., Hall DO. Immobilization of *Rhodobacter capsulatus* on cellulose beads and water treatment using a photobioreactor. *Journal of fermentation bioengineering* 1998; 86 (5): 517- 20.

(10) Bolliger R., Zürrer H., Bachofen R. Photoproduction of molecular hydrogen from waste water of a sugar refinery by photosynthetic bacteria. *Applied microbiology biotechnology* 1985;23 (2): 147- 51.

(11) Mizuno O., Dinsdale R., Hawkes FR., Hawkes DL., Noike T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresearch Technology* 2000; 73 (1): 59- 65.

(12) Lay J-J., Lee Y-J., Noike T. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research* 1999; 33 (11): 2579- 86.

(13) Tanisho S., Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. *International journal hydrogen energy* 1995; 20 (7): 541- 5.

(14) Sparling R., Risbey D., Poggi-Varaldo H. Hydrogen production from inhibited anaerobic composters. *International journal hydrogen energy* 1997; 22 (6): 563- 6.

(15) Adams MW., Stiefel EI. Biological hydrogen production: not so elementary. *Science* 1998; 282 (5395): 1842- 3.

(16) Guwy A., Hawkes F., Hawkes D., Rozzi A. Hydrogen production in a high rate fluidised bed anaerobic digester. *Water Research* 1997; 31 (6): 1291- 8.

(17) Gurijala KR., Sa P., Mormile MR. Relative significance of environmental factors affecting hydrogen production from landfilled refuse samples. *Waste Management and Research* 2000; 18 (5): 453- 61.

(18) Mata-Alvarez J., Mace S., Llabres P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresearch Technology* 2000; 74 (1): 3- 16.

(19) Cheng S., Bai M., Chang S., Wu K., Chen W., editors. Studies on the feasibility of hydrogen production hydrolyzed sludge by anaerobic microorganisms. *The 25th Wastewater Technology Conference*, Taiwan: Yunlin; 2000.

(20) Chu C., Lee D., Chang B-V., You C., Tay J. "Weak" ultrasonic pre-treatment on anaerobic digestion of flocculated activated biosolids. *Water Research* 2002; 36 (11): 2681- 8.

(21) 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. Applied *Microbiology and Biotechnology* 2010; 2 (2): 109- 13

(22) Leja K., Myszka K., Czaczyk K. The ability of *Clostridium bifermentans* strains to lactic acid biosynthesis in various environmental conditions. *SpringerPlus* 2011; 2: 8.

(23) James G., Cappuccino, Sherman N. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 10 ed: Washington DC: Tailor and Francis Group; 2013.

(24) Bergey D., Harrison F., Breed R., Hammer B., Huntoon F. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins Co; 1923.

(25) Gibbs P. Factors affecting the germination of spores of *Clostridium bifermentans*. *Journal general microbiology* 1964; 37 (1): 41- 8.

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

(27) Fletcher KE., Ritalahti KM., Pennell KD., Takamizawa K., Loffler FE. Resolution of Culture *Clostridium bifermentans DPH-1* into Two Populations, a *Clostridium sp*. and Tetrachloroethene-Dechlorinating *Desulfitobacterium hafniense Strain JH1*. *Applied and Environmental. Microbiology* 2008; 74: 6141- 3.

(28) Biebl H., Spröer C. Taxonomy of the Glycerol Fermenting *Clostridia* and Description of *Clostridium diolis sp. nov*. *Sys. Applied microbiology* 2002; 25 (4): 491- 7.

(29) Myszka K., Leja K., Olejnik-Schmidt AK., Czaczyk K. Isolation process of industrially useful *Clostridium bifermentans* from natural samples. *Journal of bioscience and bioengineering* 2012; 113 (5): 631- 3.

---

[1]- Chen
[2]- Sequencing
[3]- 1kb ladder

Isolation and molecular identification of *Clostridium bifermentans* from anaerobic lagoons of wastewater treatment system

Majid Moghbeli *
Associate Professor of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran, moghbeli552@gmail.com
Mohammadreza Shafaati
M.Sc. of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran, mohammadreza.shafaati@gmail.com

Abstract

Introduction: *Clostridiumbifermentans* is a non pathogenbacteria and first isolated by Tissier and Martelli in 1992. This bacteria with a view to taxonomy has a close relationship with the *Clostridiumsourdilli* and is able to produce a wide range of metabolites such as acetic acid, lactic acid, formic acid, ethanol, butanol, acetone, carbon dioxide, nitrogen and specially hydrogen as clean source energy. The aim of this study was to isolate and molecular identify *Clostridium bifermentans*.

Materials and methods: With aim to isolation of *Clostridium bifermentans*, the anaerobic wastewater samples from Mahdishahr sewage treatment laggons cultured on asynthetic complex medium and incubated anaerobically at room temperature. Chromosomal DNA isolated from grown bacteria and the *16s rRNA* gene amplified with PCR. The PCR product was sequenced and purified.

Results: Isolated bacteria from a macroscopic view on the complex media has white colonies and from a microscopic view was rod-shaped Gram-positive and had spore. of the *16s rRNA* gene sequencing, isolated bacteria belong to the species *Clostridium bifermentans* which is called IRI2 strain and were recorded in gene bank with acception number KC525132.

Discussion and conclusion: In this study a strain of *Clostridium bifermentans* was separated and identified with *16S rRNA* sequencing method. With respect to the ability of this bacteria to produce various industrial products, this bacteria is to be used especially for production of hydrogen as biogas.

Key words: *Clostridium bifermentans*, Wastewater, Identification, *16SrRNA*

* Corresponding author
Received: August 18, 2013 / **Accepted:** April 20, 2014