مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره نوزدهم - تابستان ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تولید سلولز میکروبی با استفاده از گونه های بومی *سودوموناس لوتئولا*

سجاد یزدان ستاد[۱*]، راحله طاهری[۲]، هاتف آجودانی فر[۳]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دامغان، ایران
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، دامغان، ایران
۳. استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، دامغان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سلولز یکی از پرمصرف‌ترین پلیمر های زیستی جهت تولید کاغذ، منسوجات و مواد پزشکی می باشد. با توجه به محدودیت منبع اصلی سلولز و حفظ منابع طبیعی، یکی از روش های جالب تولید سلولز روش میکروبی است. از طرف دیگر، دلیل خالص نبودن سلولز گیاهی و همراهی با لیگنین و همی سلولز، استفاده از سلولز باکتریایی که پلیمری خالص می باشد، ارجحیت دارد. این مطالعه به منظور جداسازی باکتری بومی سودوموناس لوتئولا جهت تولید سلولز و بررسی کیفیت و کمیت تولید سلولز توسط آن انجام گرفت.

مواد و روش ها: چندین نمونه از سرکه های محلی، آبمیوه ها و میوه ها در محیط هسترین-شرام آگار کشت داده شدند. باکتری سودوموناس لوتئولا با آزمون های بیوشیمیایی جداسازی و با روش تایپینگ مولکولی تایید شد. پس از کشت باکتری در محیط هسترین-شرام براث، سلولز در محیط تولید شد. لایه سلولزی تولید شده، پس از تیمار با SDS و NaOH خالص سازی و خشک گردید. در نهایت، هضم آنزیمی با سلولاز و بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) سلولز تولید شده را تایید کرد.

یافته ها: باکتری گرم منفی سودوموناس لوتئولا از نمونه های تهیه شده جداسازی شد. سپس باکتری در محیط هسترین-شرام براث کشت داده شد و پس از ۶ روز گرماگذاری در ۳۰ درجهٔ سانتی گراد، سلولز تولید شد. نتایج هضم آنزیمی نشان دهندهٔ حضور سلولز در محیط کشت باکتری بود. بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره نیز نشان داد که سلولز تولید شده توسط این باکتری دارای ساختار فیبری و شبکه مانند است.

نتیجه گیری: این مورد، اولین گزارش تولید سلولز توسط جدایهٔ بومی سودوموناس لوتئولادر ایران است. کیفیت و کمیت سلولز تولید شده توسط این باکتری در مقایسه با سلولز تولید شده با سویهٔ استاندارد مطلوب ارزیابی شد، لذا به عنوان منبع جدید تولید سلولز معرفی می گردد.

کلمات کلیدی: سلولز، هسترین-شرام، سودوموناس لوتئولا، میکروسکوپ الکترونی نگاره

مقدمه

سلولز یکی از پرمصرف‌ترین مواد طبیعی جهت تولید کاغذ، منسوجات و مواد پزشکی می باشد. با توجه به محدودیت منبع اصلی سلولز و حفظ منابع طبیعی، یکی از روش های جالب تولید سلولز روش میکروبی است. سلولز میکروبی برای اولین بار توسط براون[۱] در سال ۱۸۸۶ و با استفاده از *گلوکونواستوباکتر زایلینوم* تولید شد (۲). سلولز باکتریایی پلی ساکارید میکروبی است که از نظر شیمیایی با سلولز گیاهی مشابهت دارد. این پلیمر از واحد های [۱→۴] β فرم D-گلوکز تشکیل شده است که مشابه آن را در گیاهان می توان یافت. با این حال به دلیل خالص نبودن سلولز گیاهی و همراهی با لیگنین و همی سلولز، استفاده از سلولز باکتریایی که پلیمری خالص می باشد

نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دامغان، ایران
پست الکترونیکی: sajjad.yazdansetad@gmail.com
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۲/۱۹
تاریخ پذیرش : ۱۳۹۳/۰۴/۰۲

۱ Brown

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.5.7]

ارجحیت دارد. کاربرد سلولز خالص چه نوع تیمار شده گیاهی و چه نوع باکتریایی آن در پزشکی، صنایع غذایی، صنایع کاغذ، محیط زیست و غیره می باشد (۷). از کاربرد های اساسی سلولز در پزشکی می توان به استفاده از آن به عنوان جایگزین رگ های خونی و تهیهٔ پانسمان زخم، پوست مصنوعی، دارو های کاهندهٔ درد، سرم های کاهندهٔ کلسترول، اعضای مصنوعی و مواد آرایشی و بهداشتی اشاره نمود. از سلولز در صنایع غذایی به عنوان غلظت‌دهنده (بستنی ها و سالاد ها) و در تهیهٔ محصولات رژیمی و گوشت مصنوعی استفاده می شود. امروزه استفاده از سلولز تولید شده توسط میکروارگانیسم ها نسبت به نوع گیاهی آن در پزشکی به عنوان پوشانندهٔ زخم و بافت های مصنوعی ارجحیت دارد که دلایل آن علاوه بر خالص بودن سلولز باکتریایی، استحکام و مقاومت بالا در مقایسه با نوع گیاهی، استفاده از باکتری های غیر بیماریزا جهت تولید سلولز بیشتر و مقرون به صرفه است. از سلولز تولید شده توسط باکتری ها پس از پاکسازی، در پانسمان زخم ها استفاده می شود که شبکه ای بر روی زخم قرار می گیرد و از نفوذ باکتری ها و آلودگی های محیط به زخم ها جلوگیری نموده علاوه بر این، با آبرسانی مناسب زخم می تواند به سرعت باعث بهبودی زخم شود (۵). سلولز مادهٔ اولیه جهت استحصال اتانول به عنوان منبع فرعی انرژی و سوخت زیستی[۲] نیز محسوب می شود (۱۱).

سلولز باکتریایی در مقیاس وسیع، به طور عمده توسط باکتری های مربوط به جنس گلوکونواستوباکتر[۳] تولید می شود و از این بین، گونهٔ گلوکونواستوباکتر زایلینوم[۴] بیشترین میزان سلولز را تولید می کند (۹). علاوه بر این نشان داده شده است که برخی از جنس های سودوموناس نیز توانایی تولید سلولز را دارند (۳). جهت تولید سلولز از این باکتری ها از محیط کشت پای های هسترین-شرام[۵]استفاده می شود که در طول بیوسنتز سلولز، باکتری ترکیبات مختلف محیط را مصرف کرده و زنجیره های خطی بتا را تولید می کند. مطالعهٔ فراساختار سلولز با میکروسکوپ الکترونی نگاره[۶]، وجود منافذ ریز نانومتری و ساختار مشبک آن را نشان می دهد (۵).

این مطالعه به منظور جداسازی باکتری سودوموناس لوتئولا[۷] جهت تولید سلولز و بررسی کیفیت و کمیت تولید سلولز توسط آن انجام گرفت. به منظور سنجش کیفیت و کمیت تولید، سلولز تولید شده توسط این باکتری با سویه استاندارد گلوکونواستوباکتر زایلینوم تولید کنندهٔ سلولز مقایسه گردید.

مواد و روش ها

جداسازی سودوموناس لوتئولا

در این مطالعه، جهت جداسازی سودوموناس لوتئولا تولید کنندهٔ سلولز از سرکه های مختلف محلی، انواع آبمیوه ها و میوه ها استفاده شد. نمونه های فوق در نرمال سالین استریل سوسپانسیون شده و بر روی محیط هسترین-شرام آگار (Merck, Germany) شامل گلوکز ۲درصد، پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، دی سدیم هیدروژن فسفات بدون آب ۰/۲۷ درصد، اسید سیتریک مونوهیدرات ۱۵/ ۰درصد، آگار باکتریولوژیک ۰/۵ درصد و تنظیم شده در ۵ pH کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. جهت جداسازی باکتری از مشخصات مورفولوژیکی، روش رنگ آمیزی گرم و آزمون های بیوشیمیایی عمومی و اختصاصی نظیر کاتالاز، اکسیداز، ایندول، حرکت، سولفید هیدروژن (H_2S)، ذوب ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، هیدرولیز کازئین، مصرف قند های رامنوز و زایلیتول استفاده شد (۱۶و۱۷و۲۰).

شناسایی ایزوله بر اساس تعیین توالی قطعهٔ 16S rRNA استخراج DNA باکتری

با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن (DN ۸۱۱۵C) انجام گرفت. چگالی نوری (OD) DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر (Biowave, UK) سنجیده شد.

تکثیر قطعهٔ 16S rRNA باکتری با استفاده از واکنش زنجیر های پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیر های پلیمراز با روش استاندارد (۱۹) و با استفاده از پرایمر های (F: ۵'-GTTTGATCCTGGCTCAG-۳', R: ۵'-TACCTTGTTACGACTTCA-۳') در دستگاه ترمال سایکلر (Peqlab, UK) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای۷۲ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس محصول واکنش الکتروفورز گردید (۱). در نهایت، قطعهٔ تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (MacroGen, Korea) فرستاده شد.

---

2 Biofule

3 *Gluconacetobacter*

4 *Acetobacter xylinum*

5 Hestrin-Schramm

6 (Scaning Electron Microscope (SEM

7 *Pseudomonas luteola*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.5.7]

تولید سلولز توسط سودوموناس لوتئولا

یک کلنی از باکتری به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت هسترین-شرام مایع در فلاسک ارلن مایر تلقیح و جهت تولید سلولز در محیط کشت ایستا در ۳۰ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۶ روز گرمخانه گذاری شد. این کار به جهت تشکیل لایهٔ سلولزی در سطح محیط کشت در فلاسک و جداسازی لایهٔ سلولزی از محلول زیرین انجام گرفت (۷، ۲۰، ۲۱). سپس میزان تولید سلولز حاصل با سویهٔ استاندارد میکروبی گلوکونواستوباکتر زایلینوم (PTCC No. ۱۷۳۴) به عنوان شاهد که از مرکز کلکسیون باکتری ها و قارچ های صنعتی ایران خریداری شده بود، مقایسه گردید در مرحلهٔ بعد، جهت پاک سازی و تیمار ابتدا لایهٔ سلولزی تولید شده در سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۲ درصد به مدت ۲ ساعت و بعد در هیدروکسید سدیم (NaOH) ۵ درصد به مدت ۱ ساعت در بنماری جوشانده شد. در نهایت لایهٔ سلولزی جهت حذف ناخالصی ها و رسیدن به pH خنثی، چندین بار توسط آب مقطر شستشو داده شد و بعد در دمای اتاق خشک شد ضمن اینکه وزن تر و خشک لایه سلولزی نیز پس از خالص سازی، با استفاده از ترازوی دیجیتالی حساس سنجیده شد (۵، ۲۳).

آزمون های تاییدی سلولز

واکنش هضم آنزیمی با سلولاز

لایه سلولز به فلاسک ارلن مایر تمیز حاوی بافر سیترات ۱ مولار و آنزیم سلولاز (Sigma, USA) انتقال یافت. ۵۰ میلی لیتر از آنزیم سلولاز ۲/۵ درصد در بافر سیترات ۱ مولار (۲۹/۵ میلی لیتر سدیم سیترات ۱ مولار به علاوه ۲۰/۵ میلی لیتر اسید سیتریک ۱مولار) تهیه و به فلاسک اضافه گردید. جهت کامل شدن واکنش هضم آنزیمی، فلاسک به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد قرار گرفت (۲۴).

بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

لایه سلولزی خالص و خشک شده بر روی پایهٔ مسی[8] قرار گرفت و توسط لایه ای از طلا جهت عکسبرداری پوشانیده شد. عکسبرداری توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل Leo-۴۳۵VP (SEMTech Solutions, USA) با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر و ولتاژ ۲۰۰۰۰ ولت انجام شد (۴).

یافته ها

جداسازی سودوموناس لوتئولا

از ۲۰ نمونهٔ مختلف سرکه های محلی، انواع آبمیوه‌ها و میوه‌ها باکتری سودوموناس لوتئولا جداسازی شد. در بررسی با رنگ آمیزی گرم، باکتری به صورت باسیل گرم منفی بود. کلنی های باکتری پس از ۳ روز گرماگذاری در ۳۰ درجهٔ سانتی گراد در محیط کشت هسترین-شرام آگار مشاهده شد که به رنگ سفید مایل به کرمی، کروی با حاشیهٔ مزرس، محدب، فاقد قوام کر های و به قطر mm ۱-۰/۵ بودند. آزمون های موفولوژیکی و بیوشیمیایی و در نهایت تعیین توالی قطعهٔ 16S rRNA باکتری و مقایسه آن با توالی های موجود در بانک اطلاعاتی وب سایت NCBI[9] نیز جدایهٔ مورد نظر را تایید کرد.

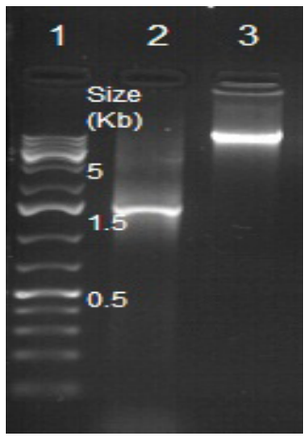
شناسایی ایزوله بر اساس تعیین توالی قطعهٔ 16S rRNA

استخراج DNA باکتری

DNA استخراج شده از باکتری کیفیت مطلوب داشت (شکل۱)، بطوریکه چگالی نوری (OD ۲۶۰/۲۸۰) DNA استخراج شده OD=۱.۵۳ و غلظت آن ۴۹۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود.

تکثیر قطعهٔ 16S rRNA باکتری با استفاده از واکنش PCR

تکثیر توالی 16S rRNA باکتری یک باند مناسب در اندازهٔ در حدود ۱۴۹۴ جفت باز را نشان داد (شکل۱). توالی تعیین شدهٔ قطعهٔ ژنی با نرمافزار بلاست موجود در سایت بانک ژنوم[10](NCBI, Blast) بررسی شد و شباهت ۹۶درصدی با باکتری سودوموناس لوتئولا نژاد KC۴۲۹۶۳۳.۱ را نشان داد.



شکل۱-

ستون ۱: سایز مارکر O'Gene Ruler, Fermentas)۱kb plus)،

ستون ۲: قطعهٔ تکثیر یافته در اندازهٔ حدوداً ۱۴۹۴ جفت بازی،

ستون ۳: DNA استخراج شده از باکتری.

تولید سلولز توسط سودوموناس لوتئولا

تشکیل لایهٔ سلولزی در سطح محیط کشت هسترین-شرام براث پس از گذشت ۶ روز تایید کنندهٔ تولید سلولز توسط باکتری سودوموناس لوتئولابود (شکل۲). سلولز تولید شده پس

۸ Copper grade

۹ www.ncbi.nlm.nih.gov

۱۰ http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.5.7]

از تیمار با SDS و NaOH و شستشو با آب مقطر به منظور حذف ناخالصی ها و شفاف سازی به صورت لایهٔ نازک مشاهده گردید. وزن تر و خشک سلولز تولید شده توسط جدایه، پس از تخلیص به ترتیب ۱۶/۸ و ۰/۱۱ گرم و توسط سویهٔ استاندارد (گلوکونواستوباکتر زایلینوم) به ترتیب ۱۹/۲ و ۰/۱۸ گرم بود. میزان تولید خالص سلولز با محاسبهٔ وزن خشک آن (۰/۱۱ گرم) بر حسب مقدار اولیهٔ محیط کشت (۲۵ میلی لیتر) با چشم پوشی از خطا های احتمالی آزمایش، در حدود ۴/۴ گرم بر لیتر برآورد شد. مقایسه کیفی و کمی سلولز تولید شده نشان داد که سلولز تولید شده دارای کیفیت مطلوب و مشابه با الگوی استاندارد بوده ولی از نظر میزان تولید در مقایسه با سویهٔ استاندارد کمتر می باشد.

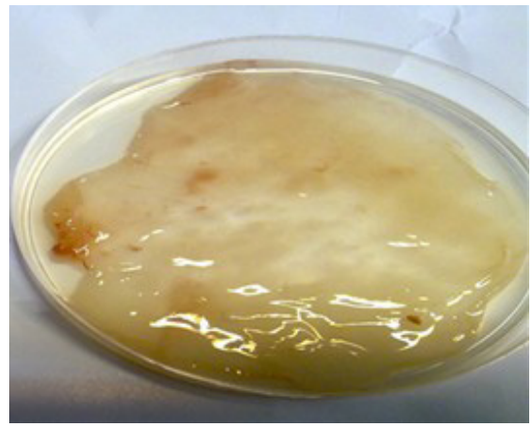
آزمون های تاییدی سلولز

واکنش هضم آنزیمی با سلولاز

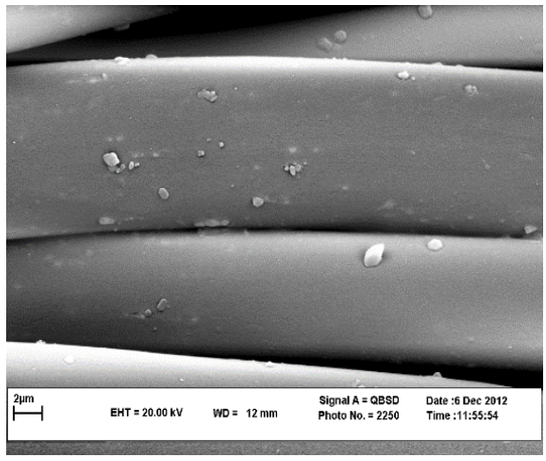
لایه سلولزی به دست آمده پس از اضافه کردن آنزیم سلولاز و بعد از حدود ۲ ساعت کاملاً توسط آنزیم حل شد بطوری که محلول یکنواخت و شفافی حاصل گردید که ناشی از هضم سلولز موجود با آنزیم سلولاز بود.

بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

بررسی فراساختار سلولز میکروبی تولید شده و تیمار شده با SDS و NaOH با میکروسکوپ الکترونی نگاره ساختار فیبری آن را نشان داد (شکل۳).



شکل۲- سلولز میکروبی تولید شده توسط سودوموناس لوتئولا.



شکل۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از سلولز تولید شده بعد از تیمار

بحث

سلولز یکی از پرکاربردترین بیوپلی مر ها است که دارای اهمیت ویژه در صنایع مختلف مانند صنایع چوب و کاغذ، نساجی، صنایع غذایی و در زمینه های پزشکی مانند پانسمان زخم، سیستم های رهایش دارو، پیوند های عروقی، داربست و بستر برای رشد مجدد بافت است (۸، ۲۲). جایگزینی منابع متداول و رایج تولید سلولز با منبع میکروبی، دارای مزایایی از قبیل زمان، انرژی و هزینهٔ کاهش یافته در روند تولید سلولز است. علاوه بر آن، سلولز تولید شده با منبع میکروبی دارای خواص مطلوب از نظر استحکام و دوام نیز بوده و عاری از ناخالصی هایی چون لیگنین، پکتین و همی سلولز (سه ناخالصی اصلی سلولزطبیعی) می باشد. این نوع سلولز میکروبی درجه پلیمریزاسیون بالا دارد و به فرآیند هایی نظیر پخت و سفیدگری جهت خالص سازی نیازی ندارد. علاوه بر آن، امکان تولید سلولز رنگی، مشتقات سلولز و نیز سلولزی با قابلیت های خاص نیز فراهم می باشد (۱۲و۱۵). سلولز میکروبی، پلی ساکارید تولید شده توسط باکتری های مختلف از جنس گلوکونواستوباکتر، آگروباکتر، ازتوباکتر، آئروباکتر، آلکالیژنز، سارسینا، ریزوبیوم، آکروموباکتر، و سودوموناس است (۳). موثرترین باکتری تولید کنندهٔ سلولز، گلوکونواستوباکتر زایلینوم است که جهت مطالعات پای های و کاربردی سلولز استفاده می شود (۹)، لذا در این مطالعه کیفیت و کمیت تولید سلولز توسط باکتری جدا شده با سوش استاندارد گلوکونواستوباکتر زایلینیوم مقایسه شد بطوریکه سلولز تولید شده توسط باکتری جدا شده از نظر کیفیت مطلوب ارزیابی شد هر چند از نظر مقدار تولید با اندازه گیری وزن تر و خشک سلولز و مقایسهٔ آن با نمونهٔ استاندارد، کمتر از سوش استاندارد

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.5.7]

بود. سودوموناس لوتئولا یکی از باکتری های مولد سلولز است که در این پژوهش، از نمونه های مختلف سرکه های محلی و میوه ها جداسازی گردید و برای اولین بار جهت تولید سلولز در ایران استفاده شد.

در سال ۲۰۰۸ السعید[11] و همکاران از گونهٔ سودوموناس لوتئولا و تعدادی دیگر از باکتری ها، جهت تولید سلولز استفاده کردند. آن ها با استفاده از محیط پایهٔ هسترین-شرام در محیط ایستا پس از ۷ روز توانستند ۴/۷ گرم بر لیتر سلولز تولید کنند (۶). محیط هسترین-شرام و کشت ایستا، در مطالعات کونگروآنگ[12] و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ جهت تولید سلولز از گلوکونواستوباکتر زایلینوم جدا شده از آبمیوهٔ آناناس نیز مورد استفاده قرار گرفت. آن ها از محیط هسترین-شرام با اندکی تغییرات اعمال شده و پس از ۶ روز در شرایط تخمیری با استفاده از محیط کشت ایستا توانستند سلولز بیشتری را تولید کنند (۱۳). در سال ۲۰۰۹ میکلسن[13] و همکاران در دو مورد تحقیق جداگانه از محیط هسترین-شرام برای جداسازی باکتری گلوکونواستوباکتر زایلینوم و تولید سلولز استفاده کردند که در یک مورد مطالعه از سوکروز و در مورد دیگر از گلیسرول به عنوان منبع کربنی استفاده شد (۱۸). مقدار سلولز تولید شده با استفاده از سوکروز به عنوان منبع کربنی ۳/۸۳ گرم بر لیتر و با استفاده از گلیسرول ۳/۷۸ گرم بر لیتر پس از گذشت ۹۶ ساعت بود. جاهان[14] و همکاران در سال ۲۰۱۲ از سبزیجات، سرکه و سیب گندیده در محیط هسترین-شرام تحت شرایط بهینه با استفاده از گلوکز ۱٪ ، عصاره مخمر ۱/۵٪، پپتون ۰/۵٪، دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۲٪، سیترات ۰/۱۱٪ و اتانول ۰/۴٪ تعدادی باکتری گلوکونواستوباکتر زایلینوم و سودوموناس لوتئولا را جداسازی و برای تولید سلولز استفاده کردند. آن ها با گرماگذاری باکتری ها به مدت ۱۰-۶ روز در محیط ایستا توانستند ۴/۵ گرم بر لیتر سلولز توسط سودوموناس لوتئولا و ۱۰ گرم بر لیتر سلولز توسط گلوکونواستوباکتر تولید کنند. درنهایت سلولز تولید شده را با میکروسکوپ الکترونی و روش رزونانس مغناطیسی هست های (NMR[15]) بررسی و ساختار فیبری آن را تایید کردند (۱۴). حال آنکه در تحقیق حاضر نیز مطابق با تحقیقات پیشین از سرکه، میوه ها و آبمیوه های مختلف به عنوان منبع جداسازی باکتری استفاده شد، ضمن اینکه از محیط پای های هسترین-شرام نیز با اندکی تغییرات جهت بهینه سازی استفاده شد و باکتری سودوموناس لوتئولا با توانایی تولید مناسب سلولز جداسازی گردید. میزان سلولز تولید شده توسط ایزوله در محیط کشت ایستا پس از گذشت ۶ روز در ۳۰درجهٔ سانتی گراد در حدود ۴/۴ گرم بر لیتر بود. دست یابی به مقدار مناسب تولید سلولز در مطالعات شرام و هسترین نیز درهمین دما و محیط کشت ایستا حاصل گردید. بنابر اظهار آن ها استفاده از محیط کشت ایستا به دلیل بدام انداختن حباب های سلولز، متابویسم باکتری را جهت تولید سلولز افزایش می دهد. گذشته از این، در افزایش استحکام سلولز و درجهٔ پلی مریزاسیون آن نیز تاثیرگذار است (۱۰). لذا در مطالعهٔ حاضر نیز محیط کشت ایستا جهت تولید سلولز ترجیح داده شد. مقدار سلولز تولید شده در مطالعهٔ ما با توجه به نزدیکی شرایط تولید در مقایسه با مطالعات جا هان و همکاران با اغماض خطا های احتمالی آزمایش تقریباً برابر بود. بررسی فراساختار سلولز با میکروسکوپ الکترونی نیز ساختار فیبری آنرا بر طبق تصویر میکروسکوپی (شکل۳) و مطابق با تحقیقات گذشته تایید کرد.

نتیجه گیری

برجستگی این پژوهش در جداسازی باکتری بومی سودوموناس لوتئولا برای اولین بار در ایران و عدم نیاز باکتری به شرایط خاص محیطی جهت رشد و تکثیر و نیز زمان مناسب در روند تولید محصول سلولز بود. با توجه به نتایج این تحقیق مبنی بر تولید سلولز با کیفیت مطلوب توسط باکتری و نیز با مد نظر قرار دادن حداقل نیاز های غذایی و رشد و تکثیر باکتری جدا شده، به عنوان منبع جدید و بومی تولید سلولز معرفی و پیشنهاد می گردد.

سپاسگزاری

از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان برای تأمین منابع مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می شود.

11 El-Saied
12 Kongruang
13 Mikkelsen
14 Jahan
15 resonance magnetic Nuclear

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.5.7]

منابع

1. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, and Oyaizu H .Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on16 S rRNA sequence. Int J Syst Evol Microbiol. 2000: 50(4): 1563-1589.

2. Brown, Jr. RM. Microbial cellulose: a new resource for wood, paper, textiles, food and specialty producs. 1999; Position paper, Internet: http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/position1.htm.

3. Bellamy WD. Biotechnology report: single cell proteins from cellulosic wastes. Biotechnol Bioeng. 1974; 16(7): 869-880.

4. Costa LM, de Olyveira GM, Basmaji P, and Filho LX. Nanopores structure in electrospun bacterial cellulose. J biomater nanobiotechnol. 2012; 3(1): 92-102.

5. Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, and Brown RM. Microbial cellulose, the natural power to heal wounds. Biomaterials. 2006; 27(2): 145-151.

6. El-Saied H, El-Diwany AI, Basta AH, Atwa NA, El-Ghwas DE. Production and characterization of economical bacterial cellulose. BioResources. 2008; 3(4): 1196-1217.

7. Evans B, O'Neill H, Malyvanh V, Lee I, and Woodward J. Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells. Biose ns Bioelectron. 2003; 18(7): 917–923.

8. Fontana JD, de Souza AM, Fontana CK, Torriani IL, Moreschi JC, Gallotti BJ, et al. Acetobacter cellulose pellicles as a temporary skin substitute. Appl Biochem Biotechnol. 1999; 24(1): 253-264.

9. Geyer U, Klemm D, and Schmauder HP. Kinetics of the utilization of different C sources and the cellulose formation by Acetobacter xylinum. Acta Biotechnol. 1994; 14(3): 261-266.

10. Hestrin S, Schramm M. Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. II. Preparation of freeze dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. Biochem J. 1954; 58(2): 345-352.

11. Klemm D, Heublein B, Fink HP, and Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angew Chem Int Edn Engl3358-3393 :(22)44 ;2005 ..

12. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, and Marsch S. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. Prog Polyme Scie. 2001; 26(9): 1561-1603.

13. Kongruang S. Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum strains from agricultural waste products. Appl Biochem Biotechnol. 2008; 148(1-3): 245-256.

14. Jahan F, Kumar V, Rawat. G, and Saxena, RK. Production of microbial cellulose by a bacterium isolated from fruit. Appl Biochem Biotechnol. 2012; 167(5): 1157-1171.

15. Jonas R, and Farah LF. Production and application of microbial cellulose. Polym Degrad Stab. 1998; 59(1-3): 101–106.

16. Masaoka S, Ohe T, and Sakota N. Production of cellulose from glucose by Acetobacter

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.5.7]

xylinum. J Ferment Bioeng. 1993; 75(1): 18-22.

17. Matsunaga M., Tsuchida T, Matsushita K, Adachi O, and Yoshinaga F. A synthetic medium for bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans. Bioscioi Biotechnol Biochem. 1996; 60(4): 575-579.

18. Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA, and Gidley MJ. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus strain ATCC 53524. J Appl Microbiol. 2009; 107(2): 576-583.

19. Sambrook J, Russell D. Irwa N et al. Eds. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd Ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; Vol 2, Chap 8. pp: 18-24.

20. Sattler K, and Fiedler S. Production and application of bacteria cellulose: II. Cultivation in a rotating drum fermentor. Zentralbl Mikrobiol. 1990; 145(4): 247-252.

21. Thawatchai M, Seiichi T, and Ratana R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. Carbohydr Polym. 2008; 72(1): 43-51.

22. Williams WS, and Canon RE. Alternative environmental roles for cellulose producted by Acetobacter xylinum. Appl Envi Microbial. 1989; 55(10): 2448-2452.

23. Yang G, Xie JJ, Hong F, Cao ZJ, and Yang XX. Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. Carbohydr Polym. 2012; 87(1): 839-845.

24. Zhang YH, and Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. Biotechnol Bioeng. 2004; 88(7): 797-824.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.5.7]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.5.7] [Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-10-12]