مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره چهارم (پیاپی ۲۱) زمستان ۱۳۹۳
صفحات ۳۲۸-۳۲۱

Original Article

جداسازی، شناسایی و ارزیابی تولید صمغ زانتان توسط *زانتوموناس کامپستریس* جدا شده از برگ های درختان لیمو

صبا امیری کجوری*[۱]، زهیر حشمتی پور[۲]، اسمعیل قربانعلی نژاد[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۳] مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: صمغ زانتان یک هتروپلی ساکارید خارج سلولی است و توسط باکتری های جنس *زانتوموناس* که برای تعداد زیادی از گیاهان به عنوان آفت محسوب می شوند، سنتز می گردد. این مطالعه با هدف جداسازی و تشخیص سویه *زانتوموناس* از برگ های درختان لیمو ترش و تولید صمغ زانتان در آنها انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت مقطعی بر روی برگ های درختان لیموترش آلوده به شانکر باکتریایی انجام گرفت. جداسازی عامل بیماری با استفاده از محیط کشت YDC انجام شد. کلنی های به دست آمده با کلنی های *زانتوموناس کامپستریس* PTCC 1473 از نظر خصوصیات مورفولوژیکی مورد مقایسه قرار گرفتند. برای تولید صمغ زانتان از محیط تولید صمغ استفاده شد. به منظور شناسایی نهایی باکتری جداسازی شده از روش *16S rRNA* استفاده گردید.

یافته ها: در این مطالعه یک سویه جدید *زانتوموناس کامپستریس* به نام saba.ton شناسایی و با شماره دسترسی KF706548.1 در بانک ژن ثبت گردید. میزان تولید صمغ زانتان این جدایه در محدوده g/100ml ۱/۵-۰/۰۸۱گزارش گردید.

نتیجه گیری: در این مطالعه یک سویه جدید از باکتری *زانتوموناس* جداسازی گردید. این سویه به عنوان یک سویه بومی ایران بدون بهینه سازی شرایط رشد دارای توان بالقوه ای در تولید صمغ زانتان بود.

واژگان کلیدی: *زانتوموناس*، صمغ زانتان، برگ درخت لیمو ترش، *16S rRNA*.

دریافت مقاله: تیرماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: مهرماه ۹۳

مقدمه

صمغ زانتان یک پلی ساکارید خارج سلولی است که توسط باکتری *زانتوموناس کامپستریس* (*Xanthomonas campestris*) و برخی دیگر از گونه های *زانتوموناس* تولید می گردد. این ترکیب برای تعدادی از گیاهان مانند مرکبات (۱)، برنج (۲)، گردو (۳)، چغندرقند (٤) و غیره به عنوان آفت محسوب می شود. *زانتوموناس کامپستریس* باکتری گرم منفی، هوازی اجباری، میله ای شکل به عرض ۰/۸-۰/۲ و طول ۲-۰/٦ میکرومتر می باشد. دارای تاژک قطبی بوده و بر روی محیط کشت آگار کلنی های زرد رنگ و موکوئیدی ایجاد می نماید (۵). صمغ زانتان در سال ۱۹۵۰ در گروه کشاورزی ایالت متحده کشف شد. این گروه در غربالگری انواع زیادی از بیوپلیمرها نقش مهمی دارند (٦). صمغ زانتان به عنوان یکی از مهم ترین پلی ساکاریدهای میکروبی تجاری شناخته شده است (۷). این صمغ امروزه کاربرد بسیار وسیعی در صنایع مختلف مانند صنایع غذایی (شامل صنایع لبنی، کمپوت، کنسرو، سس، صنایع نانوایی و ...)، دارویی، نساجی، رنگ، چسب سازی، سرامیک سازی، صنایع نفت، صنایع نظامی، کشاورزی، تغذیه دام و غیره دارد (۸ و ۹). به همین دلیل بهینه سازی رشد این

* آدرس برای مکاتبه: مازندران، تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه میکروب شناسی. تلفن: ۰۹۱۱۳۹۱۵۷۸۷ پست الکترونیک: Saba_amiri12@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

میکروب مورد علاقه بسیاری از محققان و صنایع مربوطه قرار گرفته است (۱۰).

ویژگی های منحصر به فرد صمغ زانتان شامل حلالیت در آب سرد و گرم، ایجاد محلول های بسیار ویسکوز با غلظت کم صمغ و خواص شبه پلاستیک آن است که منجر به کاربرد بسیار وسیع این صمغ به عنوان عامل سوسپانسیون کننده، تثبیت کننده، تغلیظ کننده به ویژه در صنایع غذایی و آمیزندگی، روان کننده، تغلیظ کننده و کنترل جریان در صنایع استخراج و پالایش نفت گردیده است (۸ و ۱۱). صمغ زانتان ماده ای غیر سمی و غیر حساسیت زا است که اثری بر پوست و چشم ندارد. به همین دلیل به عنوان ماده افزودنی غذایی بدون محدودیت در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی به صورت گسترده مصرف می گردد. تاکنون مطالعات گسترده ای در مورد ایمنی صمغ زانتان صورت گرفته است. به همین دلیل در ۱۹ مارس ۱۹۶۹، سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA)، صمغ زانتان را به عنوان افزودنی مجاز به مواد غذایی معرفی کرد. خاصیت سودوپلاستیسیته (شبه پلاستیک) این ماده باعث می شود که ماده غذایی، احساس دهانی بهتر و رهاسازی طعم بیشتری داشته باشد. هم چنین این صمغ باعث می شود که مواد غذایی هنگام خروج از حالت انجماد مایع کمتری تراوش کند و کیفیت اولیه خود را حفظ نماید (۱۲).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی سویه *زانتوموناس* از برگ درختان لیمو ترش و بررسی تولید صمغ زانتان توسط آن بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری و جداسازی: این مطالعه به صورت مقطعی بر روی برگ های علامت دار درختان لیموترش جمع آوری شده از شهرستان جیرفت در استان کرمان در بهمن ماه سال ۱۳۹۱ انجام شد. برگ های علامت دار درختان لیموترش آلوده به شانکر باکتریایی بودند (شکل ۱). نمونه ها درون پاکت های کاغذی قرار داده شدند و به آزمایشگاه دانشگاه تنکابن منتقل گردیدند. با استفاده از تیغ استریل نقاط قهوه ای رنگ بافت مرده و برجسته روی برگ ها جداسازی و درون هاون کوبیده و نرم شدند. نمونه ها به لوله آزمایش حاوی آب مقطر استریل منتقل و چند دقیقه با شیکر مخلوط گردیدند (۱۳). در ادامه سوسپانسیون ایجاد شده بر روی محیط کشت YDC (yeast extract dextrose $caco_3$) به صورت سفره ای کشت داده شد و در دمای ۲۸ درجه سیلیسیوس به مدت ۲٤ ساعت گرماگذاری گردید. پس از بررسی های ماکروسکوپی، به منظور به دست آوردن کلنی تک بر روی محیط کشت YDC، کشت خطی صورت گرفت (۱٤ و ۱۵).

ب) شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: کلنی تک جداسازی شده با کلنی تک *زانتوموناس کامپستریس* خریداری شده از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران با کد PTCC 1473، از نظر شکل کلنی، رنگ و لزج بودن در محیط کشت YDC (حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۲۰ گرم گلوکز، ۲۰ گرم $CaCo_3$، ۱۷ گرم آگار در حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر) مورد بررسی قرار گرفت (۱٦). به منظور تایید جدایه از رنگ آمیزی گرم و آزمون های رایج بیوشیمیایی مانند کاتالاز به روش شاد (۱٤)، اکسیداز به روش کوواکس (۱۷) و هیدرولیز نشاسته به روش فهی و هی وارد (۱۸) استفاده گردید.

ج) تولید صمغ زانتان: برای این منظور از دو محیط کشت استفاده شد. محیط کشت اول با عنوان محیط کشت اولیه (Pre culture) حاوی ترکیبات ۰/۱ گرم عصاره مخمر،

شکل ۱: برگ لیمو ترش آلوده به شانکر باکتریایی مرکبات.

Archive of SID
www.SID.ir

۰/۲ گرم گلوکز، ۰/۲ گرم $CaCo_3$ در حجم ۱۰ میلی لیتر بود. پس از آماده سازی این محیط، یک کلنی از جدایه مورد نظر در شرایط استریل به آن تلقیح شد. ارلن در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سیلیسیوس و سرعت ۲۰۰ g به مدت ۳ روز نگهداری شد تا توده زیستی کافی تولید شود (۱۶). پس از ۳ روز باکتری به محیط کشت تولید صمغ (Production Culture) در حجم ۹۰ میلی لیتر منتقل گردید. ترکیبات این محیط شامل ۲ گرم عصاره مخمر، ۰/۳ گرم گلوکز، ۰/۰۲ گرم $MgSo_4$ ،$7H_2O$ و ۰/۵ گرم KH_2PO_4 بود (۱۰). پس از استریل و آماده سازی محیط کشت درون ارلن، ۱۰ میلی لیتر از توده زیستی تولید شده در محیط پیش کشت به ۹۰ میلی لیتر از محیط تولید صمغ افزوده و در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سیلیسیوس و سرعت ۲۰۰ g به مدت ٤ روز نگهداری گردید. سپس به منظور پاستوریزاسیون و بلانچینگ، ارلن در بن ماری با دمای ۸۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد تا میکروارگانیسم ها و آنزیم های موجود در محیط کشت غیر فعال شوند. در ادامه محیط کشت تولید صمغ با ۵ حجم آب رقیق شد و با سرعت ۸۰۰۰ g به مدت ٤۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از روماند حاصله برای جداسازی صمغ زانتان استفاده شد.

مقدار ۳ برابر حجم اتانول ۹٦ درصد سرد به روماند اضافه گردید. مخلوط حاصله به مدت ٤۰ دقیقه و با سرعت ۸۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. روماند دور ریخته شد و صمغ رسوب یافته در ته لوله به مدت ۳۰ دقیقه در آون با دمای ۸۰ درجه سیلیسیوس خشک گردید (۱٦).

د) شناسایی مولکولی جدایه ها: به منظور استخراج DNA از روش فنل-کلروفرم استفاده شد. به منظور تکثیر ناحیه 16S rRNA از پرایمرهای با توالی F8: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' و R1492: 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' (شرکت Taq Kopenhagen، دانمارک) استفاده گردید. به منظور شناسایی مولکولی سویه جداسازی شده، واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر Master Mix (شرکت تاکارای ژاپن)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ٦ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده انجام شد.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Master cycler Gradient, Germany) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سیلیسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. درجه خلوص و اندازه نسبی محصول PCR به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد تعیین شد. سپس توسط شرکت ژن فناوران تعیین توالی گردید. نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه Blast در سایت NCBI بررسی گردید.

یافته ها

الف) نمونه برداری و جداسازی: پس از رشد باکتری ها، تنها یک جدایه ایجاد کلنی های زرد رنگ و لزج نمود. این جدایه برای مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲ ب).

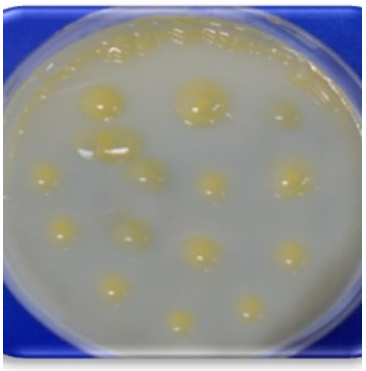
ب) شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: بر اساس مقایسه جدایه با باکتری استاندارد مرجع، باکتری جداسازی شده به صورت گرم منفی، میله ای کوتاه، هوازی اجباری، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، قادر به هیدرولیز نشاسته بود. همچنین کلنی ها در محیط YDC به صورت زرد رنگ، موکوئیدی و بسیار لزج دیده شدند (شکل۲). با این تفاوت که باکتری جداسازی شده رشد سریعتری داشت. رشد سویه مرجع در ۷۲ ساعت و رشد جدایه مورد نظر در مدت ٢٤ ساعت صورت گرفت.

ج) استخراج صمغ زانتان: با قرار دادن باکتری در محیط مایع YDC به مدت ۳ روز و در محیط تولید صمغ به مدت ٤ روز تولید صمغ زانتان انجام گرفت. وزن صمغ به دست آمده، در محدوده g/100ml ۱/۵-۰/۰۸۱ بود (شکل۳).

د) نتایج شناسایی مولکولی: پس از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی نمونه به وسیله نرم افزار Chromas مشاهده و بررسی

Archive of SID

www.SID.ir



(الف)

(ب)

شکل ۲: تشابه کلنی های*زانتوموناس کامپستریس* : الف) سویه استاندارد با کد PTCC 1473، ب) باکتری جداسازی شده (سویه *saba.ton*)

گردید. در زمان بررسی توالی Chromas چیدمان مختلفی از نقطه نظر مبدأ ردیف سازی در نظر گرفته شد تا بهترین دقت ممکن در شناسایی بر اساس توالی وجود و مقایسه آن با بانک ژنی NCBI به دست آید. شناسایی به میزان همولوژی به دست آمده با سویه مرجع در جریان ردیف سازی توالی ها بود. به این ترتیب توالی ها بسته به میزان همولوژی به دست آمده شناسایی شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که باکتری مورد نظر متعلق به خانواده *زانتوموناداسه*، جنس *زانتوموناس*، گونه *کامپستریس* می باشد. با این تفاوت که شباهتی به سویه های شناخته شده از این خانواده ندارد. بنابراین این سویه جدید در سایت NCBI با شماره دسترسی KF706548.1 به عنوان *زانتوموناس کامپستریس* سویه *صبا. تن* (*Xanthomonas Campestris strain saba.ton*) نام گذاری و ثبت گردید.

بحث

صمغ زانتان یک پلی ساکارید طبیعی و بیوپلیمر صنعتی مهم می باشد. این صمغ به دلیل خصوصیات رئولوژیکی منحصر به فردی که دارد به عنوان یکی از پلی‌ساکاریدهای میکروبی در فرآیندهای صنعتی کاربردهای گسترده ای دارد (۱۹). به طوری که در صنایع مختلف به عنوان پایدار کننده، امولسیون کننده، تغلیظ کننده، ضخامت دهنده غذا و مصارف صنعتی غیرغذایی استفاده می‌شود (۲۰).

ویژگی های بسیار مناسب این صمغ در معلق نگهداشتن قطعات و ذرات جامد نسبت به پلیمرهای دیگر در غلظت یکسان قابل مقایسه نمی باشد. پلیمرهای زانتان در برابر تجزیه باکتریایی تا دمای ۱۲۰ °C پایدار می‌باشند (۲۱).

پایداری دمای پلیمر به تشکیل شبکه فیزیکی پلیمر، وزن مولکولی و نوع گروه‌های موجود در آن بستگی دارد. با افزایش دما پیوندهای بین مولکول‌های زانتان که شبکه بیوپلیمری را تشکیل می‌دهند شکسته شده و ویسکوزیته کاهش می‌یابد (۲۲). برای تولید صمغ زانتان از *زانتوموناس کامپستریس* باید محیط کشت باکتری مناسب برای رشد میکروارگانیسم و تولید صمغ باشد.

مهم ترین منابع غذایی محیط کشت منابع کربن و ازت می باشند و بهترین و معمول ترین منبع کربن مورد استفاده گلوکز

شکل ۳: صمغ زانتان تولید شده به وسیله سویه جدید *زانتوموناس کامپستریس* سویه *saba.ton*

Archive of SID

www.SID.ir

می باشد (٦). این صمغ با اضافه نمودن گلوکز یا ساکاروز به باکتری *زانتوموناس کامپستریس* در طی یک فرآیند تخمیر تولید می شود و اکثر گونه ها صمغ زانتان را از طریق فرآیند تخمیر هوازی تولید می نمایند (۲۳).

با وجود این که *زانتوموناس ها* قابلیت تولید یک بیوپلیمر با ارزش صنعتی را دارند، اما متأسفانه هیچ تولیدی در این زمینه در ایران وجود ندارد و هر ساله سهم زیادی از سرمایه کشور صرف واردات این صمغ به دلیل مصارف گسترده صنعتی اش می‌شود. به همین دلیل مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی سویه *زانتوموناس* از برگ درختان لیمو ترش و بررسی تولید صمغ زانتان توسط آن انجام شد.

اکثر تحقیقات انجام شده در زمینه تولید میکروبی زانتان بر روی غربال کردن ریزسازواره ها و مطالعه اثر متغیرهای محیط کشت بر بازده تولید متمرکز می باشند (۲۳ و۲٤). باکتری *زانتوموناس کامپستریس* برای تولید زانتان به منابع کربن، نیتروژن، فسفر و همچنین مواد مغذی کم مقدار مانند پتاسیم، آهن و کلسیم نیاز دارد (۲٤ و ۲٦).

بهینه سازی نوع و غلظت منابع یاد شده، به ویژه منبع کربن بر بازدهی تولید صمغ و هزینه تولید موثر است. همچنین تاکنون کوشش‌های زیادی در راستای بهینه سازی شرایط و ایجاد تنوع در تخمیرهای صمغ زانتان مانند تشکیلات غذایی، تکنیک تغذیه، درجه حرارت، pH، هم‌زدن، اضافه کردن آنتیفوم و استفاده از سوبستراهای مختلف جهت تولید صمغ گزارش شده است (۲۵).

نوآوری پژوهش حاضر بر این اساس استوار بود که پس از جداسازی و تشخیص باکتری *زانتوموناس* از برگ های درختان لیمو ترش آلوده به شانکر، توانایی تولید صمغ زانتان از یک سویه بومی ایران، بدون بهینه سازی در شرایط رشد و ایجاد تغییرات در متغیرهای محیط کشت مورد بررسی قرار گیرد. در مطالعه حاضر تولید صمغ زانتان توسط سویه جدید *زانتوموناس کامپستریس saba.ton* بدون در نظر گرفتن شرایط بهینه سازی، معادل ۱/۵ g/100ml بود.

میزان صمغ به دست آمده در مطالعه وادهای (Wadhai) و دیکسیت (Dixit) در سال ۲۰۱۰ در هند در محدوده g/100ml ۱/۳۳–۰/۰٥٤ بود (۱٦). همچنین در مطالعه ای که توسط آرتی پالانیراج (Aarthy Palaniraj) و همکاران در سال ۲۰۱۱ در هند انجام شد، با بهینه سازی شرایط تولید صمغ زانتان توسط *زانتوموناس کامپستریس*، میزان صمغ تولیدی معادل g/100ml ۰/۳٦ بود (۱۰). این مقادیر کمتر از میزان صمغ به دست آمده در مطالعه حاضر می باشد.

پیشنهادهایی که در رابطه با این پژوهش می توان ذکر نمود عبارتند از: خالص سازی زانتان تولید شده از سویه جداسازی شده به منظور استفاده در مصارف غذایی و غیر غذایی، بهینه سازی شرایط رشد این سویه بومی از نظر محیط کشت، دما، pH به امید دستیابی به تولید زانتان بیشتر.

همچنین می توان با ایجاد موتاسیون در برخی از ژن های خاص، میزان سنتز زانتان را افزایش داد. از سوبستراهای ارزان قیمت مانند نشاسته یا ضایعات خشک خرما نیز می توان به عنوان محیط کشت صنعتی در این سویه بومی استفاده کرد (۲۷). در نهایت این محیط کشت های صنعتی را می توان به عنوان محیط کشت بومی در ایران معرفی نمود.

نتیجه گیری

در این مطالعه یک سویه جدید از باکتری *زانتوموناس* جداسازی گردید که نسبت به سویه مرجع دارای رشد سریع تری می باشد. این باکتری هوازی اجباری، میله ای کوتاه و کلنی های آن بر روی محیط کشت آگار، زرد رنگ و بسیار لزج می باشد. این سویه به عنوان یک سویه بومی ایران از توان بالقوه ای در تولید صمغ زانتان در محدوده g/100ml ۱/٥–۰/۰۸۱ برخوردار می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و کارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به دلیل حمایت های علمی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Montakhabi M, Rahimiyan H, Rastgar M, Jafarpur B. Studying of the possibility of control bacteria *xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, disease factor of plants, using Epifanit Antagonist bacterium in laboratory conditions. J Plant Protect. 2011; 24(4): 376-368. [In Persian]

2. Khshkdaman M, Niknejad Kazmpur M, Ebadi AA, Pedramfar H. Identification of causal agent of bacterial bight of rice in the fields of Guilan province. J Plant Protect. 2009; 23(1): 50-57. [In Persian]

3. Golmohammadi M, Alizadeh A, Rahimiyan H. The coancestry of disease factor fractionations of walnut bacterium in northern and central provinces of IRAN. J Plant Dis. 2003; 38(1,2): 9-16. [In Persian]

4. Samavatian H, Rahimiyan H. Bacterium firing of beetroot leaf arising from *xanthomonas species*. J Plant Dis. 2001; 37(4): 9-15. [In Persian]

5. Bradbury JF. Genus II: *Xanthomonas*. In: Krieg NR, Holt CG, editors. Manual of systematic bacteriology. Baltimore, MD: Williams and Wilkins. 1984: 199-210.

6. Margaritis A, Zajic JE. Biotechnology review: mixing mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. Biotechnol Bioeng. 1978; 20: 939-1001.

7. Leela K, Sharma G. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. J Biopro Eng. 2008; 23: 687-689.

8. Katzbauer B. Properties and applications of xanthan gum. Poly Degrad Stabil. 1998; 59: 81-84.

9. Yang ST, Silva EM. Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. J Dairy Sci. 1995; 78: 2541-2562.

10. Palaniraj A, Jayaraman V, Hariram SB. Influence of nitrogen sources and agitation in xanthan gum production by *xanthomonas campestris*. Adv Biotechnol. 2011; 2(3): 305-309.

11. Margaritis A, Pace GW. Microbial polysaccharides. In: Moo-Yaoung M, Blanch WH, Drew S, Wang DIC. (Eds.), Comprehensive Biotechnology. Toronto. Pergamon Press; 1985: 1005-1045.

12. Kennedy JF , Bradshaw IJ. Production, properties and application of xanthan. In: Bushell ME. Progress in industrial microbiology.19. Amsterdam. Elsevier; 1984: 319-371.

13. Sakthivel N, Mew TW. Efficacy of bacteriocinogenic strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* on the incidence of bacterial blight disease of (*oryza sativa* L.). Can J Microbiol. 1991; 37: 764-768.

14. Schaad NW. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2th ed. Am Phytopathol Soc St Paul MN. 1988: 158.

15. Wilson EE, Zeitoun FM, Fredrickson DL. Fredrickson bacterial phloem canker, a new disease of Persian Walnut trees. Phytopathol. 1967; 57: 618-621.

16. Wadhai VS, Dixit AN. Production of xanthan gum by *xanthomonas campestris* and comparative study of *xanthomonas campestris* isolates for the selection of potential xanthan producer. Indian Streams Res. 2011; 1(11): 1-4.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction. Nature. 1956; 178: 703-708.

18. Fahy PC, Hayward AC. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: Fahy PC, Persley GJ. Plant Bacterial Disease: A diagnostic guide. New York. Academic Press; 1983: 337-347.

19. Rottava I, Batesini G, Silva M, Lerin L, Oliveira D, Padilha F, Toniazzo G, Mossi A, Cansian R, Luccio M,Treichel H. Xanthan gum production and rheological behaviour using different strains of *Xanthomonas* sp. Carbohyd Polym. 2009; 77: 65-71.

20. Mohan TS, Babitha R. Influence of nutritional factors on xanthan production by *Xanthomonas malvacearum*. Scholars Res Library. 2010; 2(6): 28-36.

21. Glazer AN, Nikaido H. Microbial biotechnology. Freeman Com.1995: 272-282.

22. Petri DFS, Neto JCQ. Identification of liftoff mechanism failure for salt drillin drilling fluid containing polymer filter cake through adsorption/desorption studies. J Pet Sci Eng. 2010; 70: 89-98.

23. Garcia Ochoa F, Santos VE, Alcon E. Metabolic structured kinetic model for xanthan production. Enz Microb Technol. 1998; 23: 75-82.

24. Taher E. Optimization of xanthan production by *Xanthomonas campestris* grown on waste date extract, [dissertation]. Tehran: AmirKabir University of Technology. 2006. [In Persian]

25. Rosalam S, England R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestris* sp. Enzyme Microb Technol. 2006; 10(39): 197-207.

26. Garcia Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gómez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnol Adv. 2000; 30(18): 549-579.

27. Khosravi Darani K, Farhadi Gh, Mohammadi Far MA, Hadian Z, Seyyed Ahmadian F, Komeyli Fonud R, Haj Seyyed Javadi N, Kuhi Kamali P, Kamali Z. The comparison of xanthan production in fermentation of solid state and floating with *Xanthomonas campestris* in laboratory scale. Iran J Nutrition Sci. 2009; 4(1): 49-56. [In Persian]

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 4, January 2015

Original Article

Isolation and identification *Xanthomonas* strain from leaves of lemon trees and evaluation of production of Xanthan gum

Saba Amiri Kojuri[1], Zoheir Heshmatipur[2], Esmaeil Ghorbanalinejad[3]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
[3]Lecturer, Department of Microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Xanthan gum is a Heteropolysaccharide at the external cell of *Xanthomonas,* which acts as toxin for other plants. This study aimed to isolate and identify the *Xanthomonas* strain from leaves of lemon trees and to evaluate its ability in production of Xanthan gum.

Materials & Methods: This cross-sectional study was performed on the leaves of lemon trees infected to bacterial canker. The strain was isolated on YDC medium. The morphological characteristics colonies were compared with the colonies of *Xanthomonas campestris* PTCC 1473. Xanthan gum was produced in especial medium. A 16S rRNA procedure used to confirm the identity of strains.

Results: In this study a new strain of *Xanthomonas campestris* was isolated and was called as *saba.ton*. This strain was recorded in the gene bank with access number KF706548.1. The amount of Xanthan production was obtained 0.081 to 1.5 g/100 ml.

Conclusion: In this study a new strain of *Xanthomonas campestris* was isolated. This strain was identified as an Iranian local strain which is potentially able to produce Xanthan gum without any optimization.

Keywords: *Xanthomonas,* Xanthan gum, Lime, *16S rRNA*.

Correspondence to: Saba Amiri Kojuri

Tel: +989113915787

E-mail: Saba_amiri12@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 7(4): 321-328.

Archive of SID
www.SID.ir