Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۱۲، جلد ۴، شماره ۱، زمستان ۸۹، صفحه ۵۱ تا صفحه ۵۷

جداسازی استوباکتر زایلینوس (*Acetobacter xylinus*) جهت تولید سلولز میکروبی

رضا شاپوری[۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دانشکده علوم پایه و پزشکی، استادیار، گروه میکروبیولوژی، زنجان- ایران. rezashapoury@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۳

چکیده

سلولز میکروبی که توسط برخی از استرین‌های *Acetobacter* تولید می‌شود از لحاظ ساختار مولکولی مشابه سلولز گیاهی با این تفاوت که دارای ریز شبکه نانوفیبری با قابلیت سازش پذیری مناسبی می‌باشد. این ویژگی‌ها سبب شده تا سلولز میکروبی یک ماده خام مهم از نظر صنعتی و پزشکی برای کاربرد در تولیدات پزشکی هم چون پوست و بافت‌های مصنوعی باشد. هدف از این مطالعه جداسازی استوباکترهای مولد سلولز است. نمونه‌های تهیه شده از برخی سبزیجات و میوه‌ها در محیط SH آگار کشت و پس از جدا سازی و تائید *Axylinus* با تست‌های بیوشیمیایی تولید سلولز در محیط SH براث انجام شد. از SDS ۵٪ و NaOH۸٪ برای تیمار سلولز و در آخر سلولز به دست آمده خشک گردید. هم چنین نمونه‌هایی از سلولز تولیدی قبل و بعد از تیمار شیمیایی برای مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) با ذرات طلا پوشانیده شد. در این مطالعه یک استرین از گونه *Axylinus* جدا شد که توانایی تولید سلولز را بعد از ٦ روز گرماگذاری داشت. هم چنین تیمار شیمیایی انجام گرفته توانست ناخالصی‌های موجود در سلولز تولیدی را برطرف کند. بررسی‌های فراساختاری (SEM) نیز نشان داد که سلولز بعد از تیمار دارای ساختار شبکه مشبک بیشتری در مقایسه با سلولز قبل از تیمار است. این نتایج نشان دادند که استرین جدا شده *Axylinus* می‌تواند بالقوه به عنوان سویه مناسب جهت تولید سلولز میکروبی مورد استفاده قرار بگیرد.

کلید واژه: استوباکترزایلینوس، سلولز میکروبی، محیط کشت SH، فرا ساختار(SEM).

مقدمه

استوباکترزایلینوس باکتری گرم منفی و هوازی است که می‌تواند گلوکز، هگزوز، گلیسرول، دی-کربوکسیلیک اسید، دی هیدروکسی استون و پیروات را به سلولز خالص تبدیل کند(۱۱، ۳). این باکتری با تولید شبکه سلولزی شناور در محیط ساکن، یک لایه سطحی شامل میکروفیبریل‌های تشکیل دهنده ی نواری سلولزی را ایجاد می‌نماید. ضخامت نوارها ۴ - ۳ نانومتر و پهنای آن‌ها ۸۰-۷۰ نانومتر است. در انتها ماتریکس نوارهای به هم بافته شده، صفحه سلولزی باکتری (پلیکل) را تشکیل می‌دهند(۴،۵،۱۳). به دلیل وجود خواص هیدروفیلی و ویسکوزیته بالای لایه سلولزی، پایداری باکتری در برابر تغییرات نامطلوب مانند کاهش حجم آب، تغییرات pH، حضور ترکیبات و ارگانیسم‌های سمی، حجم آن زیاد و قادر به تکثیر و بقائ در پوشش سلولزی خود شود (۹). عوامل فیزیکی و شیمیایی از جمله نوع و غلظت منبع کربن در میزان نسبت سطح به حجم تولید سلولز موثر می‌باشند. مثلاً در غلظت پایین گلوکز (کمتر از ۱۵ گرم در لیتر)، استفاده از منابع نیتروژنی که دارای اسید آمینه‌های متیونین

www.SID.ir

Archive of SID

و گلوتامات، افزایش میزان اکسیژن از ۱۰ درصد به ۲۵ درصد، محدوده‌های دما ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷-۴ بیشترین مقدار سلولز را تولید می‌کنند (۱۱، ۳). باکتری استوباکتر زایلینوس در انسان غیربیماری‌زا بوده و سلولز تهیه شده از آن به لحاظ ساختار مولکولی با آن چه که به وسیله گیاهان سنتز می شود مشابه است. سلولز باکتریایی که به محصولات اختصاصی از متابولیسم اولیه تعلق دارد، اساساً یک پوشش محافظ است در صورتی که سلولز گیاهی نقش ساختمانی دارد. هم‌چنین سلولز میکروبی از لحاظ درجه کریستالی بالا (بالای ۶۰٪)، قدرت جذب آب بالا، مقاومت و استحکام مکانیکی درمحیط مرطوب، ساختار شبکه‌ای بسیار ظریف و قدرت شکل پذیری، از سلولز گیاهی قابل افتراق است(۷، ۶، ۵، ۲). آنزیم‌های بسیاری در کاتالیز و تنظیم بیوسنتز سلولز شرکت دارند. به طور کلی بیوسنتز گلوکز شامل ۵ مرحله متوالی است که در نهایت سنتز سلولز از UDP- گلوکز توسط سلولز سنتتاز انجام می‌گیرد(۹، ۵).سلولز میکروبی در بسیاری از صنایع مثل صنایع پزشکی، دامپزشکی، غذایی، نفتی، پوشاکی، آرایشی- بهداشتی و غیره از جمله ساخت محصولات صوتی (دیافراگم) کاربرد دارد. در پزشکی از سلولز میکروبی به دلیل دارا بودن قدرت مکانیکی بالا در شرایط مرطوب، قابلیت نفوذپذیری مایعات وگازها، کاهش درد و سوزش در پوست صدمه دیده، به عنوان پانسمان و پوست مصنوعی برای پوشش درمانی زخم استفاده می‌شود. قابلیت شکل‌پذیری سلولز میکروبی این امکان را به محققین داده که توسط آن لوله‌های سلولزی توخالی را برای ساخت رگ‌های خونی (باسیک) بسازند (۱۴، ۸). هدف از این تحقیق تولید سلولز باکتریایی توسط استوباکتر زایلینوس در محیط کشت اختصاصی SH می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی استوباکتر زایلینیوس

در این تحقیق برای جداسازی سویه استوباکتر زایلینیوس از میوه‌ها و سبزیجات مختلف استفاده شد. پس از قرار دادن پوست میوه و قطعات سبزیجات در نرمال سالین استریل از سوسپانسیون مذکور بر روی محیط SH آگار(شامل گلوکز ۲٪، پپتون ۰/۵٪، عصاره مخمر ۰/۵٪، دی سدیم فسفات بدون آب ۰/۲۷٪، اسیدسیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵٪ و آگار باکتریولوژیک ۰/۵٪، در pH ۵) کشت داده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد برای ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. به منظور تائید استوباکتر زایلینیوس آزمایش‌های تأئیدی شامل رنگ آمیزی گرم و مشاهده اشکال گرم منفی فیلامانی، بررسی شکل و قوام کلونی‌ها، تست کاتالاز، تست اکسیداز، ذوب ژلاتین و بررسی رشد در حضور اتانول، مالاشیت سبز، اسید استیک و گلوکز ۳۰٪ انجام گرفت (۱۰، ۸، ۳، ۱).

تولید سلولز میکروبی از استوباکتر زایلینیوس

به منظور تولید سلولز میکروبی، در یک لوله آزمایش، مقدار ۵ میلی لیتر از محیط کشت اختصاصی SH براث را ریخته، کلنی باکتری را در شرایط استریل به محیط تلقیح و برای ملاحظه تولید سلولز در سطح محیط کشت، لوله را در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد(۱۲، ۸، ۱). برای بررسی مقدار تولید سلولز، استاندارد بودن کدورت سوسپانسیون میکروبی ضروری است. جهت این تحقیق از لوله ۰/۵ مک فارلند با تعداد باکتری درهرمیلی لیتر آن حدود $۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول استفاده شد. از سوسپانسیون استوباکتر زایلینیوس تهیه شده، مقدار ۲ میلی لیتر به هر یک از شیشه‌های کشت حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت SH براث در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری و پس از گذشت ۱۰-۶ روز لایه‌های سلولزی تشکیل شده در سطح محیط کشت در شرایط کاملاً استریل از محلول زیرین جدا شد(۱۲، ۱۰) به جهت تیمار لایه‌های سلولزی، آن‌ها را در SDS ۵٪ به مدت ۳ ساعت در بن‌ماری و سپس ۱/۵ ساعت در NaOH ۸٪ جوشانده و لایه‌های سلولزی حاصل، به مدت ۵ ساعت با آب دیونیزه شستشو داده شدند پس از صاف نمودن لایه‌های تیمار شده و جدا شدن سلولز

www.SID.ir

Archive of SID

میکروبی کاملاً شفاف و فاقد هر گونه ناخالصی خشک و دیسک‌های سلولزی به قطر ۶ میلی‌متر تهیه و استریل تهیه شدند(۱۴). برای تعیین وزن خشک سلولز میکروبی، پس از اندازه گیری وزن مرطوب، صفحات سلولزی به مدت یک شب درانکوباتور قرار داده شد. پس از خشک شدن کامل سلولز، عمل توزین با ترازوی حساس انجام گرفت.

مطالعه ساختار سلولز میکروبی تولید شده

به منظور بررسی ساختار سلولز میکروبی توسط میکروسکوپ الکترونی، مراحل آماده سازی سلولز به طور خلاصه شامل مراحل ذیل بود (۱۲، ۱۰، ۸، ۳، ۱).

از محلول ذخیره ۴٪ از تترااکسیداسمیوم محلول کاری ۱٪ را در بافر فسفات ۰/۱مولار تهیه بافت‌ها به مدت ۷- ۶ ساعت داخل محلول حاصل قرار گرفت. صفحات سلولزی حاصل، با آب مقطر در طی ۳ مرحله و هر مرحله به مدت ۰/۵ ساعت، داخل آب مقطر غوطه ور گردید. عمل آب گیری در محلول‌های استون ۳۰٪، ۴۰٪، ۵۰٪، ۶۰٪، ۷۰٪و ۸۰٪ به مدت ۲ - ۱ساعت و در غلظت ۹۰٪ به مدت ۴ ساعت با دو بار تکرار و در غلظت استون ۱۰۰٪ برای یک شبانه روز انجام و عمل خشک کردن صفحات سلولزی حاصل با دسیکاتور انجام شد. پوشش دهی لایه‌های سلولزی حاصل به وسیله طلا به کمک دستگاه مخصوص این کار انجام گرفت. پس از اتمام مراحل آماده سازی سلولز میکروبی، با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ مدل «SM-۹۴۰A» تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه گردید (۱۲، ۱۰، ۸، ۳، ۱).

نتایج

جداسازی استوباکتر زایلینیوس

از ۷ نمونه میوه و سبزی یک سویه استوباکتر زایلینیوس جدا گردید. در بررسی رنگ آمیزی گرم استوباکتر زایلینیوس باکتری گرم منفی یا گرم متغیر با اشکال مختلف میله ای، خمیده و فلامنتوس مشاهده شد (شکل ۱).

کلنی‌های استوباکتر گزیلینوم پس از ۳ روز گرماگذاری در ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط کشت SH آگار مشاهده شدند. کلنی‌های این باکتری سفید مایل به کرم، کروی با حاشیه مزرس می باشد. قطر کلنی‌ها ۱-۰/۵ میلی متر، تخت و فاقد قوام کره ای هستند. تست کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، عدم ذوب ژلاتین و عدم رشد در حضور گلوکز ۳۰٪، مالاشیت سبز ۰/۰۱٪، اسید استیک ۵٪ و اتانول ۳٪ در مجموع موید استوباکتر زایلینیوس بودند.

تولید سلولز میکروبی از استوباکتر زایلینیوس

بررسی توانایی تولید سلولز توسط باکتری استوباکتر زایلینیوس در محیط کشت اختصاصی SH انجام گرفت. تشکیل صفحه سلولزی در سطح محیط کشت تایید کننده استوباکتر زایلینیوس است.پس از گذشت ۶-۱۰ روز تولید سلولز توسط استوباکترزایلینیوس به وضوح قابل رویت بود(شکل۲).

سلولز میکروبی پس از تیمار توسط NaOH و SDS به منظور حذف ناخالصی‌ها و شفاف سازی و جهت تهیه پودر سلولز میکروبی، سلولز تیمار شده پس از خشک شدن سلولز، به صورت لایه‌های بسیار نازک مشاهده شد(شکل ۳).

مطالعه ساختار سلولز میکروبی تولیدی توسط میکروسکوپ الکترونی

مقایسه تصاویر SEM نشان داد که سلولز بعد از تیمار دارای ساختار شبکه مشبک بیشتری در مقایسه با سلولز قبل از تیمار است(شکل ۴و ۵).

بحث و نتیجه‌گیری

پیشرفت‌های بسیاری در زمینه استفاده از مواد زیستی در سال‌های اخیر ایجاد شده است. انواع پلی مرهای طبیعی و مصنوعی در زمینه‌های مختلف پزشکی مانند پانسمان زخم، سیستم‌های رهایش دارو، پیوندهای عروقی، داربست و بستر برای رشد مجدد بافت به کار می‌روند. در میان انواع پلیمرها، پلی‌ساکاریدها به واسطه خصوصیات مطلوبی که دارند بسیار حائز اهمیت هستند. پلی‌ساکاریدهای متعددی توسط میکروب‌ها تولید می‌گردند مانند زانتان،

www.SID.ir

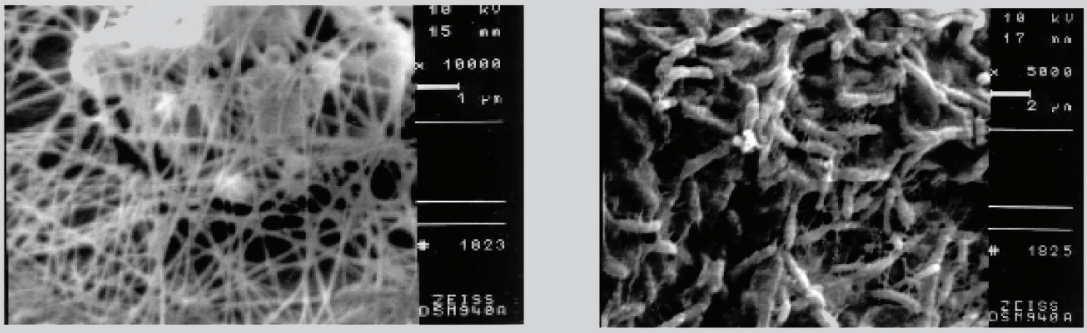
Archive of SID

شکل ۱- استوباکتر زایلینیوس با رنگ آمیزی گرم

ب الف

شکل۲- سلولز میکروبی تهیه شده از استوباکترزایلینیوس (الف- سلولز میکروبی حاصل از کشت ٦ روزه و ب- سلولز میکروبی حاصل از کشت ۱۰ روزه)

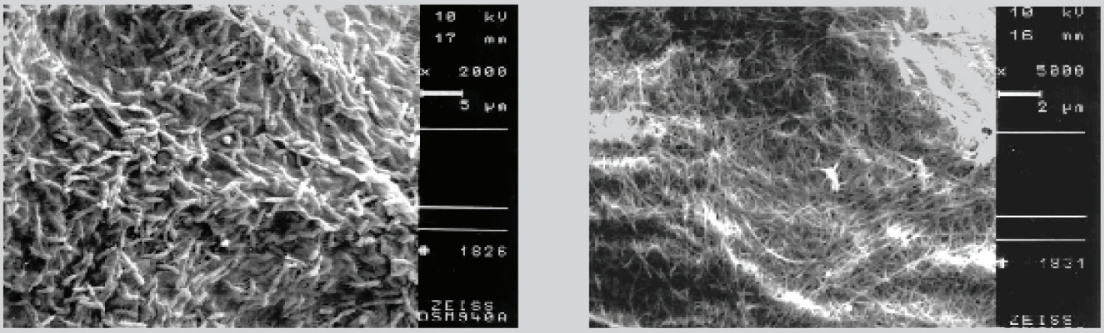
شکل ۳- سلولز میکروبی پس از خشک شدن



شکل ٤- فرا ساختارسلولز میکروبی قبل از تیمار

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- فراساختارسلولز میکروبی پس از تیمار

هیالورنیک اسید، دکستران، آلژینات و غیره که دارای خواص فیزیکی و بیولوژیکی جالبی هستند و در زمینه‌های مختلف پزشکی و غیر پزشکی کاربردهای بسیار مفیدی دارند(۱۳، ۴). استوباکتر زایلینیوس، یکی از باکتری‌های مولد سلولز است. این باکتری گرم منفی و هوازی مطلق است. استوباکتر زایلینیوس می‌تواند گلوکز، گلیسرول و سایر منابع آلی را به سلولز خالص تبدیل کند. این باکتری شبکه سلولزی شناوری را تولید می‌کند که در محیط ساکن یک لایه سطحی ایجاد می‌نماید. این لایه شامل میکروفیبریل‌هایی است که توده سلولی در حال تقسیم را در بر می‌گیرد (۱۳، ۴). سلولز میکروبی تولید شده توسط استوباکتر زایلینیوس به عنوان یکی از با ارزش‌ترین محصولات بیوپلیمری در زمینه‌های گوناگون پزشکی کاربرد دارد. کاربردهای متعددی از سلولز میکروبی در پزشکی، دامپزشکی، صنایع غذایی، نفتی، پوشاکی، آرایشی- بهداشتی و غیره شناخته شده است. داشتن استحکام مکانیکی بالا در شرایط مرطوب، قابلیت نفوذپذیری مایعات و گازها، کاهش درد و سوزش در پوست صدمه دیده، مجموعه عواملی هستند که غشاء ژلاتینی سلولز میکروبی را به عنوان یک بیوپلیمر مطلوب در زمینه پزشکی مطرح می‌سازند(۶، ۵).

استفاده از سلولز میکروبی برای اولین بار در سال، ۱۹۸۰ به عنوان پانسمانی پوشیده شده با مایع برای بهبود زخم انجام گرفت (۵). فونتانا و همکارانش از سلولز میکروبی، محصولی را با نام بیوفیل تولید کردند و جهت سوختگی‌های درجه دوم و سوم، زخم‌های عمیق، پیوند پوست و به طور کلی برای درمان آسیب‌های پوستی به کار گرفتند(۴). هدف از تحقیق حاضر بررسی امکان تولید سلولز میکروبی در ایران با استفاده از سویه‌های بومی بود و نتایج امکان تولید این ماده صنعتی را تایید نمود. در این تحقیق با استفاده از محیط کشت اختصاصی SH، تولید سلولز میکروبی توسط باکتری استوباکترزایلینیوس در محیط کشت اختصاصی SH، در محدوده دمایی (۳۰-۲۵) و pH (۷-۴) انجام گردید.

مطالعه باولرو و همکارانش بر روی سلولز تیمار یافته نشان داد که پانسمان‌های زخم تهیه شده از این نوع سلولز، قادر است اگزودای شامل آلودگی‌های باکتریایی را در ساختار ژلی چسبناک خود تثبیت کند. این محققین سوسپانسیون حاوی سودوموناس آئروژینوزا را به چنین بستر سلولزی افزودند و با مطالعه در زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده نمودند که باکتری‌ها جذب فیبرهای موجود در ساختمان ژلی سلولز می شوند. در واقع مشخص شد که باکتری‌ها در میان فیبرهای آماس یافته به دام می‌افتند. فیبرهای آماس یافته موجب کوچک‌تر شدن فضاهای موجود شده، با مسدود کردن مسیر جریان یافتن مایعات در طول فیبرها باعث بی تحرک کردن باکتری‌ها درچنین سلولز تیمار یافته ای می شوند. در نتیجه بیش از ۷۰ درصد سوسپانسیون شامل باکتری در پانسمان زخم

www.SID.ir

Archive of SID

سلولزی باقی می ماند(۴).

آن چه مسلم است، ساختار و ترتیب فیبرها و وجود گروه‌های اختصاصی که در اثر تیمارهای خاص در سلولز به وجود می آیند در توانایی آن برای جذب اگزودا و نگهداری میکروارگانیسم در بستر خود نقش دارد. در این تحقیق نیز تصاویر تهیه شده از میکروسکوپ الکترونی سلولز میکروبی تولیدی تفاوت میان ساختار سلولز طبیعی و تیمار شده را نشان می‌دهد که با تحقیقات فونتانا در سال ۱۹۹۱ منطبق بود (۴) و موید به وجود آمدن قابلیت جذب اگزوداها و ارگانیسم‌ها در سلولز پس از تیمار می‌باشد. البته جهت اعلام نظر نهایی در خصوص قابلیت زیستی سلولز میکروبی تولید شده در این تحقیق نیاز به بررسی تکمیلی بر روی ارگانیسم‌های عامل عفونت در زخم‌ها و سوختگی‌ها و هم چنین بر روی ماکروفاژها می‌باشد که این مطالعات اهداف آتی این طرح می‌باشد تا در صورت رضایت بخش بودن نتایج کلی بتوان این کالای مهم پزشکی را در ایران به صورت بومی تولید نمود.

منابع

1.Brown, R.M.(2000). Microbial cellulose: a new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products. J. Am. Chem. Soc, 107;762-771.

2.Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y., Shoda, M.(2000). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a L internal-loop airlift reactor. Biotechnol. Bioeng,129. 345-352.

3.Dearing, G.G.(2000). A new micromethod for the estimation of cellulose. Nature, 170(4559);597.

4.Fontana, J.D., De souza, A.M., Fontana, C.K., Torriani, I.L., Morescki, Y.C.(1991). *Acetobacter cellulose* pellicles as a temporary skin substitute. Appl. Biochem. Biotechnol,168;1465-1474.

5.Klemm, D. Schumann, D. Udhardt, U. , Marsch, S. (2001).Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. Progressin Polymer Science,36;1591-1603.

6.Kobayashi, S., Kashiva, K., Shimada, J.,Kawasaki, T., Shoda, S.(2006). Novel method for polysaccharide synthesis using an enzyme: the first in vitro synthesis of cellulose via a nonbiosynthetic path utilizing cellulose as catalyst. J. Am. Chem. Soc, 113; 3079-84.

7.Krystynowicz,V.,Czaja,V.,Wiktorowska-Jezierska, V., Gonc¸alves-Mis´kiewicz,M., Turkiewicz, M. , Bielecki, S.(2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. J. Indus. Microb. Biotech, 29;189-195.

8.O'Neill, H., Evans, B. , Woodward, J.(2002). Bacterial cellulose membranes. Merit Review and Peer Evaluation,47; 8-10.

9.R. Malcolm Brown, Jr. , M. Saxena ,I.(2007). Cellulose: molecular and structural biology. Biotechnol. Bioeng, 136; 307-320.

10. Sattler, K. , Fiedler, S.(1990). Production and application of bacteria cellulose: II. Cultivation in a rotating drum fermentor. J. Microbiol, 145; 247– 252.

11. Saxena, I.M., Kudlicka, K., Okuda, K., Brown, R.M.(1994). Characterization of genes in the cellulose synthesizing operon of *Acetobacter xylinum*: Implication for cellulose crystallization.J. Bacteriol,235;5735-5752.

12. Thawatchai, M., Seiichi, T., Ratana, R.(2007). Pregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial

www.SID.ir

Archive of SID

wound dressing. Microb. Biotech,3;6-7.

13. Williams, W.S., Canon, R.E.(1989). Alternative environmental roles for cellulose producted by *Acetobacter xylinum*. Appl. Envi. Microbial,26;2448-2452.

14. Wojciech Czaja, A.B., Krystynowicza, A.(2005). Stanislaw Bieleckia. R. Malcolm Brown Microbial cellulose. The natural power to heal wounds.. J. Am. Chem. Soc, 112; 2171-2179.

www.SID.ir