مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره چهارم (پیاپی ۱۷) زمستان ۱۳۹۲
صفحات ۲۸۰-۲۷۳

Original Article

# تولید سلولز توسط جدایه های باکتریایی بومی ایران

**راحله طاهری*[۱]، هاتف آجودانی فر[۲]، پرستو پورعلی[۳]**

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، دانشکده علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی

## چکیده

*سابقه و هدف:* سلولز میکروبی که توسط برخی از سویه های *استوباکتر* و *گلوکونوباکتر* تولید می شود از لحاظ ساختار مولکولی مشابه سلولز گیاهی است. این ویژگی سبب شده تا سلولز میکروبی به عنوان یک ماده خام مهم در تولیدات پزشکی و صنعتی به کار رود. این مطالعه با هدف جداسازی جنس های بومی باکتری های مولد سلولز و ارزیابی تولید آن انجام شده است.

*مواد و روش ها:* در این مطالعه ابتدا ۶۵ نمونه از سرکه های محلی، انواع آب میوه و میوه ها تهیه و بر روی محیط هسترین-شرام آگار کشت داده شدند. سپس جدایه هایی با بالاترین توانایی تولید سلولز انتخاب و با روش های بیوشیمیایی و PCR شناسایی گردیدند. پس از خالص سازی سلولز تولید شده، به منظور تایید سلولز از روش های هضم آنزیمی توسط آنزیم سلولاز و میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد.

*یافته ها:* از مجموع ۲۰ سویه با قابلیت تولید سلولز، ۵ سویه که دارای بیشترین میزان تولید بودند انتخاب شدند. پس از ارزیابی بیوشیمیایی و نیز تعیین توالی مشخص گردید که این سویه ها به گونه های *آکروموباکتر اسپانیوس*، *سودوموناس لوتئولا*، *سودوموناس دوری فلاوا* تعلق دارند. در این مطالعه وزن تر و خشک سلولز تولید شده توسط سویه های مورد مطالعه به ترتیب ۱۶/۶ و ۰/۱ گرم بود.

*نتیجه گیری:* نتایج این تحقیق نشان می دهد که تولید سلولز توسط سویه های بومی غیر از جنس *استوباکتر* و *گلوکونوباکتر* نیز قابل انجام است. به طوری که در این مطالعه برای اولین بار سویه های جدید بومی ایران از نظر تولید سلولز معرفی گردیدند. همچنین سلولز تولیدی توسط این سویه ها در مقایسه با سویه استاندارد دارای ویژگی مطلوب بود.

*کلمات کلیدی:* سلولز، *آکروموباکتر اسپانیوس*، *سودوموناس لوتئولا*، *سودوموناس دوری فلاوا*.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: تیر ماه ۹۲

## مقدمه

سلولز باکتریایی پلی ساکاریدی میکروبی است که از نظر شیمیایی با سلولز گیاهی شباهت دارد. این پلیمر از واحد های بتا ۱ به ۴ تشکیل شده است که مشابه آن را درگیاهان نیز 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، 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. از کاربردهای اساسی سلولز در پزشکی می توان به استفاده از آن به عنوان پوشاننده زخم، پوست مصنوعی و جایگزین رگ های خونی اشاره نمود (۱). امروزه استفاده از سلولز تولید شده توسط میکروارگانیسم ها نسبت به نوع گیاهی در پزشکی به عنوان پوشاننده زخم ارجحیت دارد. دلیل این امر علاوه بر خالص بودن سلولز میکروبی در مقایسه با نوع گیاهی، استفاده

*) آدرس برای مکاتبه: دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۹۶۶۹۳۵۵۲ پست الکترونیک: rahele.taheri375@yahoo.com

از باکتری های غیر بیماری زا در تولید سلولز می باشد.

از سلولز تولیدی توسط باکتری ها پس از پاکسازی آن، در پانسمان زخم ها استفاده می شود که به این ترتیب شبکه ای بر روی زخم قرار می گیرد که از نفوذ باکتری ها و آلودگی های محیط به زخم ها جلوگیری نموده و علاوه بر این با آب رسانی مناسب زخم ها می تواند به سرعت باعث بهبودی زخم شود (۲).

به طور کلی سلولز باکتریایی توسط باکتری های مربوط به دو جنس *استوباکتر (Acetobacter)* و *گلوکونوباکتر (Gluconobacter)* به عنوان یک زیست - لایه (بیوفیلم) ساخته می شود. در این میان گونه *استوباکتر گزیلینوم (A. xylinum)* بیشترین میزان سلولز را تولید می نماید. علاوه بر این نشان داده شده است که برخی گونه ها مانند *آکروموباکتر اسپانیوس (Achromobacter spanius)*، *سودوموناس لوتئولا (Pseudomonas luteola)* و *سودوموناس دوری فلاوا (P. duriflava)* نیز توانایی تولید سلولز را دارند (۳). در مسیر بیوسنتز سلولز، باکتری های نام برده ترکیبات مختلف محیط کشت شرام-هسترین (Schramm-Hestrin) را مصرف و زنجیره های خطی بتا را تولید می نمایند. مقایسه بافت میکروسکوپی این نوع سلولز با سلولز گیاهی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره وجود منافذ ریز نانومتری را در آن تایید می کند (۲). هدف از این پژوهش، جداسازی سویه هایی جدید و بومی ایران (غیر از *استوباکتر* و *گلوکونوباکتر*) با توانایی تولید سلولز و نیز ارزیابی میزان تولید سلولز توسط سویه های جدید در مقایسه با سویه استاندارد *گلوکونوباکتر زایلینوس (Gluconobacter xylinus)* بود.

## مواد و روش ها

*الف) جداسازی سویه ها:* به منظور جداسازی سویه های تولید کننده سلولز، از سرکه های مختلف محلی، انواع آب میوه و میوه استفاده شد. یک لوپ از نمونه های یاد شده بر روی محیط شرام- هسترین آگار (شامل گلوکز ۲٪، پپتون ۰/۵٪، عصاره مخمر ۰/۵٪، دی سدیم هیدروژن فسفات بدون آب ۰/۲۷٪، اسید سیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵٪ و آگار بیولوژیک ۰/۵٪، با pH ۵) کشت داده شدند. پلیت ها به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرما گذاری گردیدند. این مرحله تا به دست آمدن کلنی های خالص تکرار شد (۴-۲).

*ب) بررسی تولید سلولز:* تک کلنی های به دست آمده از مرحله قبل، به درون ارلن های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت شرام- هسترین مایع، تلقیح و برای تولید سلولز در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰-۶ روز گرما گذاری شدند. پس از آن در صورت تشکیل لایه سلولزی در سطح ارلن، لایه های سلولزی در شرایط استریل از محلول زیرین جداسازی گردیدند. میزان تولید سلولز حاصل با سویه استاندارد میکروبی *استوباکتر زایلینوس* (تهیه شده از مرکز کلکسیون باکتری ها و قارچ های صنعتی ایران با شماره PTCC 1743) مقایسه گردید (۴ و ۵).

*ج) خالص سازی لایه سلولز:* از آنجایی که لایه های سلولزی تولید شده ممکن است با اندکی ناخالصی همراه باشند، در مرحله بعد لایه های به دست آمده خالص سازی گردیدند. به این منظور، ابتدا لایه ها در محلول NaOH ۱٪ به مدت ۲ ساعت و پس از آن به مدت ۲ ساعت به منظور خالص سازی کامل، خروج باقی مانده مواد احتمالی و رسیدن به pH مناسب، به وسیله آب مقطر دیونیزه شستشو و جوشانیده شدند. سپس لایه های به دست آمده در دمای اتاق خشک شدند (۶).

*د) آزمون های تایید سلولز:*

۱- *هضم آنزیمی:* لایه سلولز خالص سازی شده درون ارلن حاوی بافر سیترات ۱ مولار وارد و سپس میزان ۵۰ میلی لیتر از آنزیم سلولاز ۲/۵٪ در بافر سیترات ۱ مولار (۲۹/۵٪ میلی لیتر سدیم سیترات ۱ مولار به علاوه ۲۰/۵ میلی لیتر اسید سیتریک ۱ مولار) به آن اضافه گردید. سپس برای کامل شدن واکنش هضم آنزیمی، ارلن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت (۷). در آخر، وجود قند های احیا کننده توسط آزمون مولیش و نوع قند توسط آزمون بندیکت، ارزیابی شدند (۸ و ۹).

۲- *بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM):* به منظور تایید ساختار سلولز میکروبی، لایه سلولزی خالص و خشک شده بر روی گرید مسی قرار گرفت و توسط لایه ای از طلا پوشانیده شد. عکسبرداری توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره Leo 435VP (SEMTech Solution, USA) با ولتاژ ۲۵۰۰۰ ولت انجام گرفت (۱۰).

*ه) شناسایی جدایه ها:*

۱- *شناسایی فنوتایپی:* بررسی های فنوتایپی شامل بررسی ویژگی های ماکروسکوپی (شکل و قوام کلنی ها) و نیز بررسی های میکروسکوپی مانند رنگ آمیزی گرم، لام مرطوب و رنگ آمیزی اسپور انجام شد. سپس بر اساس نتایج آزمون های نام برده، از سایر آزمون های متداول بیوشیمیایی مانند آزمون کاتالاز، اکسیداز، ذوب ژلاتین، ایندول، حرکت و $H_2S$ استفاده گردید (۱۱).

۲- *شناسایی ژنوتایپی با واکنش زنجیره پلی مراز (PCR):* به منظور شناسایی کامل جدایه ها در حد گونه، از روش PCR استفاده شد. در ابتدا ژنوم باکتریایی با استفاده از کیت DNP (شرکت سیناژن، ایران) استخراج گردید.

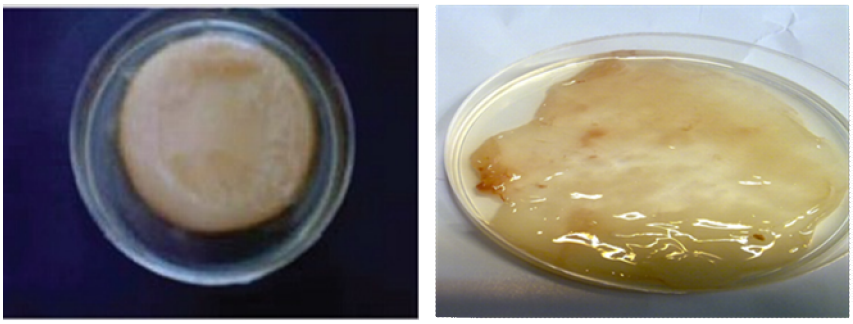
به منظور تکثیر قطعه ژنی *16S rRNA* از پرایمرهای پیشرو 5′-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3′ و پیرو 5′-ACGGGCGGTGTGTACAAG- 3′ (شرکت آرین ژن گستر، ایران) استفاده شد (۱۱). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۱/۸ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱ میکرولیتر پرایمر پیشرو (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۲/۲ میکرولیتر پرایمر پیرو (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۰/۴ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۱/۴ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۲۵ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد) انجام گردید.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (کوربت) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۹/۱ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند.

۳- *تعیین توالی قطعات حاصل از PCR:* به منظور تعیین توالی محصولات PCR، قطعه آگاروز حاوی نوار DNA بریده شد. فرآیند استخراج DNA از ژل بر اساس دستورالعمل موجود در کیت استخراج DNA از روی ژل انجام شد (Vivantis GF-1). در نهایت DNA استخراج شده به همراه پرایمر پیشرو به منظور تعیین توالی ژنوم باکتریایی به دانشگاه آکسفورد انگلیس ارسال شد. نمونه ها به صورت یک جهته تعیین توالی گردیدند و پس از دریافت نتایج، توالی های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Bioedit بررسی گردید. همچنین توالی ها با استفاده از برنامه BLAST در سایت NCBI با بانک توالی های 16S rRNA مقایسه گردیدند.

## یافته ها

*الف) جداسازی سویه های باکتریایی:* از مجموع ۶۵ نمونه سرکه های مختلف محلی، انواع آب میوه و میوه، ۴۵ کلنی بر روی محیط شرام - هسترین ظاهر شد. از این تعداد ۳۴ نمونه به عنوان باسیل های گرم منفی و بقیه به صورت گرم مثبت شناخته شدند. در نهایت ۲۰ نمونه که توانایی تولید سلولز را داشتند انتخاب گردیدند. از این میان تنها ۵ نمونه با توانایی بالای تولید سلولز شامل *آکروموباکتر اسپانیوس*، *سودوموناس لوتئولا*، *سودوموناس دوری فلاوا* و دو جنس ناشناخته جداسازی شدند. در این مطالعه وزن تر و خشک سلولز تولید شده توسط سویه های مورد مطالعه به ترتیب ۱۶/۶ و ۰/۱ گرم بودند. همچنین این میزان توسط سویه استاندارد به ترتیب ۱۹/۲ و ۰/۱۸ گرم گزارش گردید. نتایج نشان داد که سلولز تولید شده توسط سویه های مورد مطالعه دارای کیفیتی مشابه با الگوی استاندارد بوده اما از نظر میزان تولید در مقایسه با سویه استاندارد کمتر بود.



شکل ۱: تولید سلولز میکروبی توسط سویه های مورد مطالعه (سمت راست) و توسط سویه استاندارد *گلوکونواستوباکتر زایلینوس* (سمت چپ)

*ب) تولید سلولز میکروبی توسط سویه های جدید:* تشکیل صفحه سلولزی در سطح در محیط کشت شرام - هسترین آگار تایید کننده عملکرد باکتری های تولید کننده سلولز بود. پس از گذشت ۱۰-۶ روز تولید سلولز توسط باکتری های یاد شده به وضوح قابل رویت بود (شکل ۱).

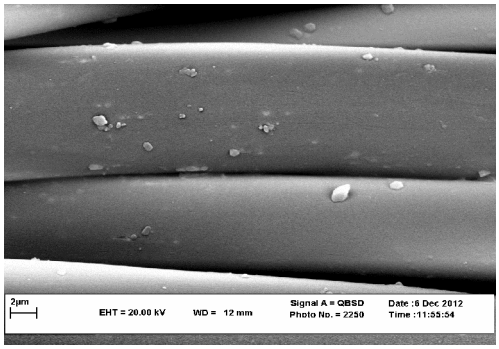
*ج) آزمون های تایید سلولز:* در آزمون های تاییدی سلولز، لایه به دست آمده به طور کامل در آنزیم سلولاز حل شد و محلول یک نواختی حاصل گردید. هم چنین در آزمون مولیش، پدیدار شدن حلقه بنفش رنگ در محلول و بین دو فاز، نشان دهنده وجود قند و در آزمون بندیکت، مشاهده رنگ قهوه ای دلیلی بر وجود قند گلوکز بود.

*د) بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره:* مطالعه فرا ساختار سلولز میکروبی به دست آمده با میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که سلولز تولیدی توسط این گروه از باکتری ها دارای ساختار شبکه مانند است (شکل ۲).

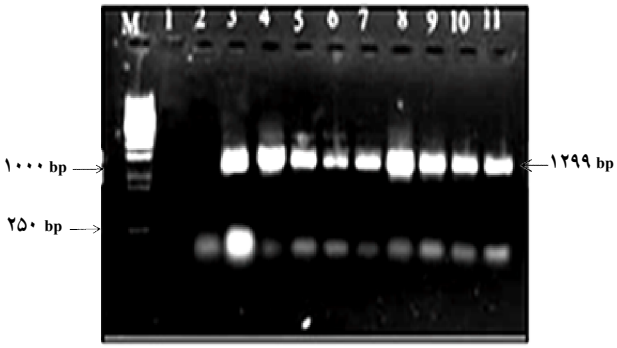
*ه) شناسایی جدایه ها:*

*۱- شناسایی ژنوتایپی و تعیین توالی:* الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ حضور قطعه ۱۲۹۹ جفت بازی را تایید نمود (شکل ۳). نتایج تعیین توالی نشان داد که ۳ جدایه به گونه های *آکروموباکتر اسپانیوس*، *سودوموناس لوتئولا*، *سودوموناس دوری فلاوا* تعلق داشتند. همچنین ۲ جدایه به صورت ناشناخته باقی ماندند (جدول ۱) و اطلاعات ژنتیکی سایرین در بانک NCBI موجود نبود. علاوه بر این با مطالعاتی که پیرامون منابع موجود انجام گردید، نتایج نشان داد که باکتری های شناسایی شده تاکنون از نظر تولید سلولز در منابع وارد نشده اند.

*۲- شناسایی فنوتایپی:* کلنی این باکتری ها پس از ۷۲-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط کشت شرام - هسترین آگار و pH ۷-۴ قابل مشاهده شدند. *سودوموناس* باکتری گرم منفی، میله ای راست یا کمی خمیده می باشد که در روش لام مرطوب دارای حرکت (تازه قطبی) و در روش مالاشیت سبز بدون اسپور مشاهده شد.




شکل ۲: تصویرمیکروسکوپ الکترونی نگاره از سلولز تولیدی نشان دهنده حضور ساختار شبکه مانند است.




شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA*، M) مارکر kb ۱ (فرمنتاز)، ستون ۱) کنترل منفی، ستون های ۳ تا ۱۱) قطعه ۱۲۹۹ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن مورد نظر.

جدول ۱: نتایج تعیین توالی به دست آمده برای نمونه های باکتریایی

| شماره باکتری | نام باکتری | شماره دسترسی | بالاترین شباهت (درصد) |
|---|---|---|---|
| ۱ | *سودوموناس لوتئولا* نژاد ۴۲۳۹ | NR_037134.1 | ۹۵ |
| ۲ | *سودوموناس دوری فلاوا* نژاد HR2 | NR_044390.1 | ۹۳ |
| ۳ | ناشناخته | | - |
| ۴ | *آکروموباکتر اسپانیوس* نژاد LMG ۵۹۱۱ | NR_025686.1 | ۹۲ |
| ۵ | ناشناخته | | - |

*آکروموباکترها* به صورت گرم منفی، میله ای کوتاه بودند که در روش لام مرطوب دارای حرکت (تاژه پیرامونی) و در روش مالاشیت سبز فاقد اسپور و در کشت های کهنه به صورت کوکسی مشاهده شدند.

همچنین در بررسی های بیوشیمیایی *سودوموناس* به صورت متحرک، اکسیداز مثبت، لاکتوز منفی در محیط مک کانکی، عدم توانایی در تخمیر قندها (در شرایط هوازی قندها را مورد مصرف قرار داده و تولید اسید می نماید) مشاهده شد. باکتری های *آکروموباکتر* دارای توانایی تجزیه قندها از جمله سوکروز در برخی گونه ها و گلوکز در گونه های دیگر، عدم تولید گاز پس از تخمیر قند و قابلیت تولید رنگدانه گزارش شدند.

## بحث

در این مطالعه ۶۵ نمونه از سرکه های محلی، انواع آب میوه و میوه ها تهیه و بر روی محیط هسترین-شرام آگار کشت داده شدند. پس از ارزیابی بیوشیمیایی و نیز تعیین توالی مشخص گردید که جدایه هایی با بالاترین توانایی تولید سلولز به گونه های *آکروموباکتر اسپانیوس*، *سودوموناس لوتئولا*، *سودوموناس دوری فلاوا* تعلق دارند. همچنین وزن تر و خشک سلولز تولید شده توسط سویه های مورد مطالعه به ترتیب ۱۶/۶ و ۰/۱گرم بود.

در سال های اخیر پیشرفت های بسیاری در زمینه استفاده از مواد زیستی حاصل شده است. انواع پلی مرهای طبیعی و مصنوعی در زمینه های مختلف پزشکی مانند پانسمان زخم، سیستم های رهایش دارو، پیوندهای عروقی، داربست و بستر برای رشد مجدد بافت به کار می روند. در میان انواع پلیمرها، پلی ساکاریدها به دلیل ویژگی های مطلوبی که دارند از اهمیت بالایی برخوردار هستند. برخی از پلی ساکاریدها مانند زانتان، هیالورنیک اسید، دکستران، آلژینات و سلولز توسط میکروب ها تولید می گردند. این ترکیبات دارای خواص فیزیکی و زیستی مناسب و هم چنین کاربردهای مفیدی در زمینه های مختلف پزشکی و غیر پزشکی می باشند. *استوباکتر زایلینیوس*، یک باکتری گرم منفی، هوازی مطلق و تولید کننده سلولز است. این باکتری می تواند گلوکز، گلیسرول و سایر منابع آلی را به سلولز خالص تبدیل نماید. از طرفی در محیط ساکن می تواند یک لایه سطحی ای از سلولز ایجاد نماید (۱۳ و ۱۴). *سودوموناس*، از دیگر باکتری های مولد سلولز است که به صورت هوازی، گرم منفی و فاقد توانایی تخمیر قندها می باشد. این باکتری عامل اصلی و مهم فساد مواد غذایی تازه سرد شده می باشد و به طور رایج در خاک و آب وجود دارد. *آکروموباکتر* نمونه ای دیگر از باکتری های مولد سلولز است که به صورت هوازی، گرم منفی و سرمادوست بوده و در فساد مواد غذایی دارای دومین رتبه پس از *سودوموناس* ها می باشد. لایه تولیدی توسط این باکتری ها شامل میکروفیبریل هایی است که توده سلولی در حال تقسیم را در بر می گیرد.

سلولز میکروبی تولید شده توسط *استوباکتر زایلینیوس* به عنوان یکی از با ارزش ترین محصولات بیوپلیمری در زمینه های گوناگون پزشکی کاربرد دارد (۱). داشتن استحکام مکانیکی بالا در شرایط مرطوب، قابلیت نفوذپذیری مایعات و گازها، کاهش درد و سوزش در پوست صدمه دیده، مجموعه عواملی هستند که غشای ژلاتینی سلولز میکروبی را به عنوان یک پلیمر زیستی مطلوب در زمینه پزشکی مطرح می سازند (۱۵ و ۱۶). استفاده

از سلولز میکروبی برای اولین بار در سال ۱۹۸۰ به عنوان پانسمانی پوشیده شده با مایع برای بهبود زخم انجام گرفت (۱۴). فونتانا (Fontana) و همکاران از سلولز میکروبی، محصولی را با نام بیوفیل تولید نمودند. این محصول برای سوختگی های درجه دوم و سوم، زخم های عمیق، پیوند پوست و به طور کلی برای درمان آسیب های پوستی به کار گرفته شد (۱۲).

کوروسومی (Kurosumi) و همکاران در سال ۲۰۰۹ توانایی تولید سلولز توسط باکتری *استوباکتر زایلینوس* NBRC 13693 را اثبات نمودند. همچنین ژنگ (Zeng) و همکاران در سال ۲۰۱۱ تولید سلولز و بهینه سازی شرایط تولید آن را به وسیله باکتری *استوباکتر زایلینوس* مورد ارزیابی قرار دادند. کاریرا (Carreira) و همکاران در همین سال توانستند سلولز را با استفاده از باکتری *استوباکتر زایلینوس* جدا شده از فاضلاب صنعتی، تولید و شرایط تولید را با این ایزوله ها بهینه نمایند. یانگ (Yang) و همکاران در سال ۲۰۱۲ به مطالعه نانوذرات نقره به صورت شیمیایی در درون بستر سلولزی تولیدی توسط باکتری ها پرداختند (۶). در مطالعه حاضر نیز تولید سلولز میکروبی به وسیله سویه های بومی جدید جدا شده از نمونه های سرکه های محلی، آب میوه و میوه ها مورد بررسی قرار گرفت. با مطالعاتی که پیرامون منابع موجود انجام شد، مشخص گردید که باکتری های شناسایی شده در این مطالعه تاکنون از نظر تولید سلولز در پژوهش های دیگر گزارش نشده اند. تمامی نتایج به دست آمده در این مطالعه در کنار ویژگی های منحصر به فرد سلولز باکتریایی آینده روشنی را برای تولید این فرآورده بیولوژیک ارزان قیمت با کاربردهای متنوع و مطلوب از سویه های باکتریایی جدید پیش بینی می نماید. همچنین ضرورت بررسی های بیشتر در مورد مکانیسم های مولکولی تولید سلولز توسط این جدایه ها و نیز شدت توانایی تولید سلولز توسط آن ها وجود دارد.

## نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می دهد که تولید سلولز توسط سویه های بومی غیر از جنس *استوباکتر* و *گلوکونوباکتر* نیز قابل انجام است. به طوری که در این مطالعه برای اولین بار باکتری های *آکروموباکتر اسپانیوس*، *سودوموناس لوتئولا*، *سودوموناس دوری فلاوا* از نظر تولید سلولز معرفی گردیدند. همچنین میزان سلولز تولید شده توسط این سویه های بومی در مقایسه با سویه استاندارد *استوباکتر زایلینوس* کمتر اما از نظر ساختاری مشابه با الگوی استاندارد (سلولز تولید شده توسط *استوباکتر زایلینوس*) ارزیابی شد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئول آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد دامغان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

## References

1. O'Neill H, Evans B, Woodward J. Bacterial cellulose membranes. Merit Rev Peer Eval. 2002; 47: 8-10.
2. Wojciech Czaja AB, Krystynowicza A, Stanislaw Bieleckia R. Malcolm brown microbial cellulose, the natural power to heal wounds. J Am Chem Soc. 2005; 112: 2171-2179.
3. Brown RM. Microbial cellulose: a new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products. J Am Chem Soc. 2000; 107: 762-771.
4. Sattler K, Fiedler S. Production and application of bacteria cellulose: II. Cultivation in a rotating drums fermentor. J Microbiol. 1990; 145: 247- 252.

**5.** Thawatchai M, Seiichi T, Ratana R. Pregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. Microb Biotech. 2007; 3: 6-7.

**6.** Yang G, Xie JJ, Hong F, Cao ZJ, Yang XX. Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. Carbohydrate Polymers. 2012; 87: 839-845.

**7.** Joseph L, Wilke T, Alpers D. Independent evolution of migration on the South American landscape in a long-distance temperate-tropical migratory bird, Swainson- swainsoni. J Biogeogr. 2003; 30: 925-937.

**8.** Hendrickson CH, Byrd LC, Hunter NW. A laboratory manual for general, organic, and biochemistry. 3rd ed. Boston. McGraw-Hill. 2001; pp: 333-342.

**9.** Benedict SR. A reagent for the detection of reducing sugars. J Biol Chem. 1908; 5(6): 485-487.

**10.** McMullan D. Scanning electron microscopy. Scann. 2006; 17(3): 175.

**11.** Bergey D, Breed R, Murray E, Ilitchens A. Bergey's manual of determinative bacteriology. 5th ed. Baltimore. Williams and Wilkins. 1939; pp: 142-189.

**12.** Calamassi R, Mori B, Moscatelli F, Alberghini S, Battisti A, Mugnai L, Surico G. Aleppo pine knot disease: histology of the knots, detection of causal agent and mode of transmission. Phytopathol Mediterr. 2008; 47: 61-72.

**13.** Fontana JD, De souza AM, Fontana CK, Torriani IL, Morescki YC. *Acetobacter* cellulose pellicles as a temporary skin substitute. Appl Biochem Biotechnol. 1991; 168: 1465-1474.

**14.** Williams WS, Canon RE. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. Appl Environ Microb. 1989; 26: 2448-2452.

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

**16.** Kobayashi S, Kashiva K, Shimada J, Kawasaki T, Shoda S. 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. 2006; 113: 3079-3084.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 4, January 2014

Original Article

# Production of cellulose from native bacterial isolates isolated in Iran

**Raheleh Taheri[1*], Hatef Ajoudanifar[1], Parstu Porali[2]**

[1]MS.c., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Shahrood Branch, Shahrood, Iran.

## Abstract

*Background and Objectives*: The microbial cellulose which is produced by some strains of *Acetobacter* and *Gluconobacter* is structurally similar to plant cellulose. Based on this feature, the microbial cellulose has been used in medical and industrial productions as an important raw material. The aims of this study were to isolate the native bacteria species producing cellulose and to evaluate their production rate.

*Materials and Methods:* In this study, 65 samples were collected from different types of local vinegars, juices and fruits and were cultivated in Hestrin-Schramm's agar medium. Afterward the isolates with maximum ability to produce cellulose were selected and identified using biochemical tests and PCR method. After purification of the cellulose, enzymatic digestions method by cellulase enzyme and scanning electron microscope were used to confirm the presence of cellulose.

*Results:* Totally, 20 strains with the cellulose production ability were isolated, of them 5 strains with maximum production ability were selected for further investigation. Base on biochemical tests and sequencing method, theses isolates were classified as *Acromobacter spanius*, *Pseudomonas luteola* and *Pseudomonas durifulva*. In this study, the wet and dried weight of the cellulose production were measured as 16.6 and 0.1g, respectively.

*Conclusion:* According to the findings, the cellulose can be produced by native isolates other than *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In this study, the new native strains of produced cellulose were introduced for the first time in Iran. Also, the produced cellulose by these species has suitable traits in comparison with standard strains.

*Keywords:* Cellulose, *Acromobacter spanius*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas durifulva* .

**Correspondence to**: Raheleh Taheri.

Tel: +989196693552

E-mail: rahele.taheri375@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 6(4): 273-280.