عزل وتشخيص بكتريا *Acetobacter* المنتجة للسيليلوز

محمد عمر محي الدين الهام اسماعيل الشمري عامر حميد الدهان

الملخص

أمكن في هذه الدراسة عزل 60 عزلة بكتيرية تعود ألى جنس ***Acetobacter*** على أربعة أوساط زرعية وبالاعتماد على الصفات الزرعية للمستعمرات والصفات المظهرية للخلايا وبعض الفحوص الفسلجية والكيموحيوية ،وتبين أن 12 عزلة منها منتجة للسيليلوز فأكملت عليها الفحوص الفسلجية والكيموحيوية للتعرف على نوعها، فجاءت الفحوص مطابقة تماما لصفات النوع ***Acetobacter xylinum*** ،وتم اختيار أكفأ عزلة منتجة للسيليلوز بالاعتماد على التقدير الكمي له، إذ بلغت كمية السيليلوز المنتجة من هذه العزلة 1.31 غم / لتر وأطلق عليها **A. xylinum48 .FEA** .

المقدمة

يعد السيليلوزمن أكثرالبوليمرات انتشارا" في الطبيعة إذ يكون الجزء الأكبر من الكتلة النباتية. وفي الوقت ذاته ينتج من قبل العديد من الأحياء الأخرى مثل الطحالب والفطريات والبكتريا والاحياء البحرية (2 ،7 ،12 و18) ويشابه السيليلوز البكتيري السيليلوز النباتي في مكوناته الكيميائية (**chemical composition**) إلا انه يختلف عنه من حيث التركيب (**structure**) مما يؤثر في خواصها الميكانيكية (**mechanical properties**). وتعد بكتريا حامض الخليك ***Acetobcter xylinum*** التي أعيد تصنيفها إلى ***Gluconoacetobacter xylinum*** نموذجا" للأحياء المجهرية المنتجة للسيليلوز وأساسا" لآلية دراسة إنتاجه (6، 12) .تنمو هذه البكتريا بسهولة على سطوح بعض الأغذية مثل عصير قصب السكر والمشروبات المتخمرة والخل وعصير جوز الهند والفواكه التالفة (3 ، 17 و18).استخدمت البكتريا ***A. xylinum*** نموذجا" لانتاج السيليلوز البكتيري عام 1954 من قبل **Hestrin**و **Schramm** اللذين اكدا إن هذه االبكتريا تنتج السيليلوز في طور الراحة. اعقبهما دراسة **Colvin** عام 1957 في الموضوع نفسه. في حين ركزت جميع الدراسات اللاحقة على شرح آليات الانتاج والسيطرة عليه (4) .

هدفت الدراسة الحالية الى عزل بكتريا ***Acetobcter xylinum*** المنتجة للسيليلوز من مصادر غذائية امنة مختلفة وتشخيصها على مستوى النوع بالاعتماد على الفحوص الفسلجية والكيموحيوية للتأكد من هويتها كي يتسنى لنا فيما بعد استخدام السيليلوز المنتج في تطبيقات التصنيع الغذائي مثل صناعة القشطية .

المواد وطرائق البحث

أستخدمت مصادر عزل مختلفة لعزل بكتريا ***Acetobacter*** المنتجة للسيليلوز شملت الخل (تمر وتفاح ودبس) وام الخل , تم الحصول عليها من الاسواق المحلية لمدينة بغداد /العراق , وتم تصنيع البعض منها منزليا وعينات من التفاح التالف . أستعملت في العزل أربع طرائق باستخدام اربعة أوساط زرعية، استخدم بالطريقة الاولى وسط **Hoyer s medium** ووسط **YGC** (8) بعد تعقيمهما بالمؤصدة في درجة حرارة 121 م لمدة 15 دقيقة وبضغط 15 باوند /انج^2.وأستخدم الوسط**Fratear medium** بالطريقة الثانية المذكورة من قبل **Wajdi (16)** , كما استخدم وسط **Hoyer s medium** بعد تحويره بأضافة الكلوكوز له بتركيز 2% في عملية العزل بالطريقة الثالثة بالخطوات المذكورة نفسها من قبل **Emily** وجماعته (8). واخيرا أستخدمت طريقة **Lisdiyanti** وجماعته (14) في عملية العزل

جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الثاني

كلية الزراعة – جامعة بغداد– بغداد، العراق.

بأستخدام وسط معزز للعزل Enrichment media for isolation .أجريت عملية العزل بنقل 1مل من التخافيف المناسبة لمصادر العزل المختلفة الى أوساط العزل Hoyer s medium و Hoyer s medium المحور ووسط معززللعزل السائلة المجضرة في أنابيب أختبار . أستخدمت طريقة التخطيط Streaking methed للعزل على وسط Fratear medium . حضنت الاطباق والانابيب في درجة حرارة 30 م لمدة 48 ساعة . أخذت مسحة من النمو الغشائي على الاوساط باستعمال أبرة التلقيح وزرعت بطريقة التخطيط على الوسط Fratear medium . حضنت الاطباق في درجة حرارة 30 م لمدة 48ساعة . التقطت المستعمرات النامية بصورة منفردة والمحاطة بهالة شفافة من وسط Fratear medium واعيد زرعها على الوسط نفسه لاكثر من مرة للحصول على عزلات نقية .أختبرت قدرةالعزلات على انتاج السيليلوز حسب الطريقة التي أوردهاSon وجماعته (15) بتلقيح 50 مل من وسط Hestrin Schram (HS- medium) بلقاح حجمه 2.5مل لكل عزلة من العزلات في دورق زجاجي بحجم 300 مل, وحضنت في درجة حرارة 30 م لمدة 7 أيام .أجريت بعد ذلك غربلة كمية للعزلات بوساطة تقدير كمية السيليلوز المنتج تحت الظروف التجريبية نفسها, بتحضير اللقاح بأستخدام مزرعة بعمر 48 ساعة للعزلات المختلفة واجراء التخافيف العشرية المناسبة والزرع بطريقة صب الاطباق على الوسط YGC(بأستثناء CaCO3) والحضن في درجة حرارة 30 م لمدة 48 ساعة ومن ثم حساب عدد البكتريا واستخدام التخفيف المناسب لقاحاً في عملية انتاج السيليلوز أستخدمت طريقة المزارع الساكنة لانتاج السيليلوز , بتلقيح دوارق زجاجية سعة 300مل احتوت على 50 مل من وسط الانتاج المعقم HS- medium بمقدار 2.5مل من اللقاح , بحيث يحوي المل الواحد على حوالي 10 خلية / مل . حضنت الدوارق في درجة جرارة 30 م لمدة 7 أيام . أستخلص السيليلوز بأنتهاء مدة الحضن حسب الطريقة التي أوردها Son وجماعته (15) . أجريت مجموعة من الفحوص لتشخيص العزلة 48 *Acetobacter* على مستوى النوع منها الصفات المزرعية (1), والخواص المظهرية بأستخدام المجهر الضوئي المركب واهم الخواص الفسلجية والكيموحيوية والتي من خلالها يمكن تصنيف هذه العزلة والتي شملت فحص أكسدة الكحول وفحص الكاتليز والاوكسيديز وانتاج الكيتونات من الكليسرول حسبما ا وردها Gibbs و Shapton (9) وفحص أستهلاك الكربوهيدرات وتكوين الغاز وفحص الحركة كما أشار Koby و Ronald .(13) وفحص أنتاج الصبغات حسبما اوردها العاني (1). وللتأكد من هوية البوليمر المنتج من البكتريا المعزولة أجري فحص بأستخدام المجهر الضوئي المركب لرؤية الالياف المكونة للسيليلوز أضافة لاستخدام فحص X- ray للمقارنة بينه وبين سيليلوز نباتي معروف الهوية .

النتائج والمناقشة

عزل بكتريا *Acetobacter*

أمكن في هذه الدراسة الحصول على 60 عزلة من بكتريا *Acetobacter* من مصادر طبيعية مختلفة اشتملت على كل من التفاح التالف والخل المصنع من مصادر مختلفة هي التمر والدبس والتفاح وأم الخل التي يكثر فيها هذا النوع من البكتريا. إذ أشارا Emily وجماعته (8) و Lisdiyanti, وجماعته (14) إلى وجود بكتريا *Acetobacter* *Gluconoacetobacter* في المشروبات الكحولية والخل وعصير الفواكه، خاصة عصير التفاح والإزهار والتربة وعسل النحل وعصير قصب السكر والأغذية المتخمرة والمخللات ومنتوج nata في البلدان الاستوائية مثل اندنوسيا والفلبين وتايلاند . أمكن عزل 15 عزلة على الوسط المتخصص Hoyer's medium والخاص بعزل الأجناس العائدة لهذه البكتريا. إذ ظهر النمو على شكل أغشية على سطح الوسط الزرعي السائل ونقل جزء من النمو الغشائي إلى YGC Medium والتقطت المستعمرات المحاطة بهالة شفافة clear zone نتيجة تحلل كاربونات الكالسيوم بسبب الظروف الحامضية الناتجة من نمو البكتريا. في حين تم الحصول على 16 عزلة على وسط Fratear

medium المستخدم من قبل Wajdi (16) في عزل هذا الجنس من التفاح التالف وأم الخل وخل التفاح وخل الدبس وخل التمر. إما فيما يتعلق بوسط Hoyer's medium المحور بإضافة الكلوكوز بنسبة 2% (1). فقد عزلت بوساطته 12 عزلة مصدرها خل التفاح وخل التمر وأم الخل والتفاح التالف، نقل بعدها جزء من النمو الغشائي الموجود على سطح هذا الوسط إلى وسط YGCوالتقطت المستعمرات المحاطة بهالة شفافة ، إما بقية العزلات فقد تم الحصول عليها من الوسطالمعززEnrichment media للعزل والتي مصدرها خل التمر وخل التفاح وخل الدبس وأم الخل والتفاح التالف.

قابلية العزلات على انتاج السيليلوز

أجريت غربلة أولية لتمييز العزلات المنتجة للسيليلوز من غير المنتجة من خلال تنمية جميع العزلات على وسط الإنتاج (HS- medium) وملاحظة قدرتها على إنتاج السيليلوز وطبيعة السيليلوز المنتج. تبين إن 12 عزلة فقط من أصل 60 أعطت نتيجة موجبة لإنتاج السيليلوز cel^+ إما البقية فكانت سالبة لإنتاج السيليلوز cel^-. ويبين جدول (1) العزلات الموجبة لإنتاج السيليلوز وطبيعة السيليلوز المنتج ووسط العزل. اذ يلاحظ إن أربعا" من العزلات المعزولة باستخدام وسطي Hoyer's medium وYGC Medium كانت منتجة لسيليلوز ذي طبيعة رقائقية، في حين ان أربع عزلات أخرى تم الحصول عليها من الوسط Fratear medium، كانت ثلاث منها تنتج سيليلوزاً رقائقياً وواحدة تنتج سيليلوزاً غشائياً. إما فيما يتعلق بالعزلات المستحصل عليها من وسط Hoyer's medium المحور بإضافة 2% كلوكوز فكانت واحدة منتجة للسيليلوز الغشائي، وأمكن الحصول على ثلاث عزلات اثنتان منها منتجة للسيليلوز الغشائي وواحدة منتجة للسيليلوز الرقائقي من الوسط المعزز للعزل Enrichment media. وقد أشار Bielecki (4) إلى إن السيليلوز المنتج من البكتريا قد يكون غشائيا" أو على شكل رقائق (قطع من السيليلوز) اعتمادا" على نوع السلالة. ولم يكن تمييز العزلات المنتجة للسيليلوزبكميات كبيرة عن تلك المنتجة بكميات اقل ممكنا" في هذه المرحلة من الدراسة لذلك اجرى على جميع العزلات اختبار كمي.

جدول 1: العزلات الموجبة لإنتاج السيليلوز وطبيعة السيليلوز المنتج ووسط العزل

رقم العزلة	وسط العزل	القدرة على إنتاج السليلوز	طبيعة السيليلوز المنتج
1	Hoyer's medium+ YGC Medium	+	قطع
3	Hoyer's medium+ YGC Medium	+	قطع
7	Hoyer's medium+ YGC Medium	+	قطع
8	Hoyer's medium+ YGC Medium	+	قطع
18	Fratear medium	+	غشائي
20	Fratear medium	+	قطع
24	Fratear medium	+	قطع
26	Fratear medium	+	قطع
32	Hoyer's medium+ YGC Mediumالمحور	+	غشائي
44	Enrichment media	+	غشائي
48	Enrichment media	+	غشائي
54	Enrichment media	+	قطع

الغربلة الكمية للعزلات المنتجة للسيليلوز

يظهر الجدول (2) الاختلاف في قابلية العزلات على إنتاج السيليلوز باستخدام وسط الإنتاج. إذ تراوحت كمية السيليلوز المنتجة ما بين 0.24 إلى 1.31 غم / لتر، وكانت اعلى إنتاجية للعزلة رقم 48، إذ بلغت كمية السيليلوز

المنتجة **1.31** غم/ لتر وعلى شكل غشاء اعلى الوسط الزرعي. وعلى هذا الأساس تم اختيار هذه العزلة لإكمال هذه الدراسة. إن الاختلاف في كمية السيليلوز المنتج بين العزلات المختبرة قد يعود إلى تباين فعالية إنزيم **pyrophosphorylase** والذي له أثر مهم في تخليق وإنتاج السيليلوز، فضلا" عن تأثير الظروف البيئية لعملية الإنتاج (**4**) .

جدول**2**: التقدير الكمي للسيليلوز المنتج من العزلات المنقاة من مرحلة الغربلة الأولية

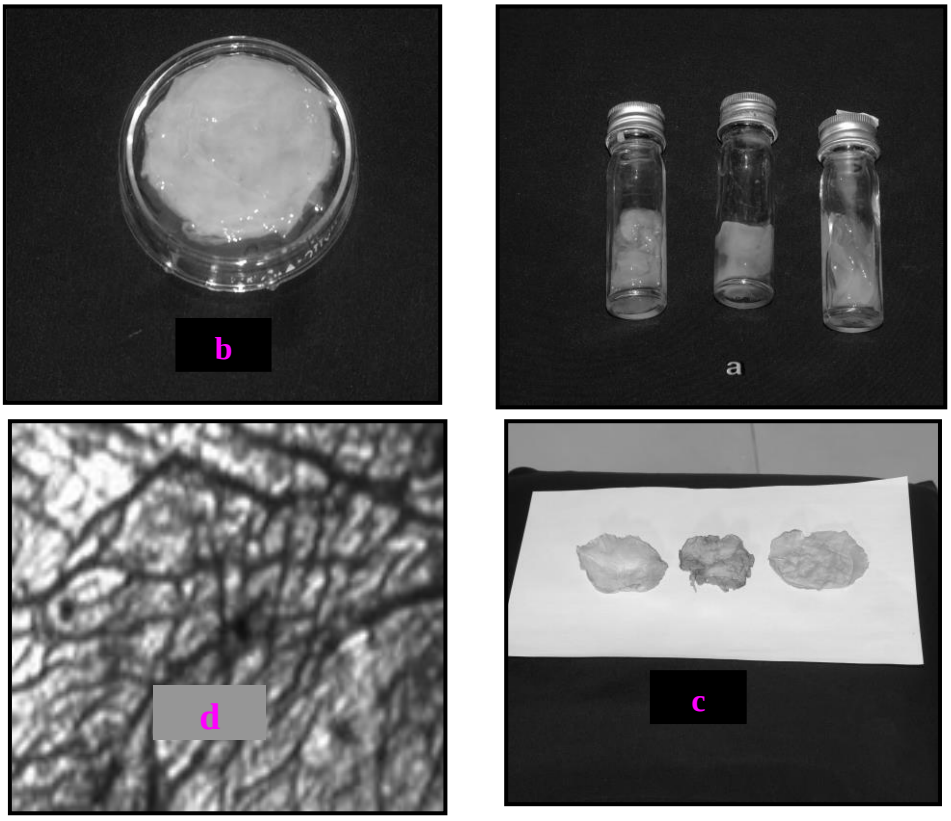
رقم العزلة	كمية السيليلوز (غم/لتر)
1	**0.75**
3	**1.00**
7	**0.69**
8	**1.05**
18	**0.98**
20	**0.58**
24	**0.50**
26	**0.24**
32	**0.81**
44	**0.91**
48	**1.31**
54	**0.25**

تشخيص العزلة ***Acetobacter*48 على مستوى النوع

أجريت دراسة لمجموعة من الخصائص الشكلية (المورفولوجية) والمزرعية والفسلجية والكيموحيوية للعزلة **Acetobacter 48** لتشخيصها على مستوى النوع بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية الواردة في بعض المراجع العلمية المتخصصة (**5**). وكما هو موضح في الجدول (**3**)، علما" إن بعض هذه الفحوص قد أجريت في المراحل الأولى من الدراسة بغية التأكد من عائدية العزلات إلى الجنس **Acetobacter** ويلاحظ من الجدول الخصائص المميزة لهذا النوع والتي من اهمها عدم القدرة من النمو على وسط **Hoyer's medium** لعدم قدرتها على استهلاك الكحول الذي يمثل المصدر الوحيد للكربون في هذا الوسط. كما تميزت هذه العزلة بقدرتها على اكسدة الايثانول الى ثنائي اوكسيد الكربون والماء، اذ لوحظ في البداية تكون اللون الاصفر حول المستعمرات البكتيرية نتيجة اكسدة الكحول الى حامض الخليك ومن ثم اختفاء اللون الاصفر بسبب اكسدة حامض الخليك الى ثنائي اوكسيد الكربون والماء، وكما لوحظ عدم قدرة هذه العزلة على انتاج الصبغات، وقدرتها على الحركة لامتلاكها الاسواط. وقد اشارت العديد من المراجع العلمية ومنها (**9**) الى ان الفحوص الثلاثة المشار لها في اعلاه تعد من اهم الفحوص التي تميز جنس ***Acetobacter*** عن جنس ***Acetomonus*** القريب منه جداً. ويلاحظ من الجدول ايضاً قدرة العزلة على استهلاك العديد من السكريات مصدراً للكربون عدا سكر اللاكتوز ، وهذا ما يميزها عن بكتريا ***Psuedomonus*** والتي تتميز بقدرتها على استهلاك اللاكتوز مصدراً وحيداً للكربون (**5**). ان فحص انتاج السيليلوز وانتاج الكيتونات من الكليسيرول، اذ تلونت المستعمرات في نهاية مدة الحضن باللون الاحمر عند اضافة كاشف فهلنك بسبب اختزال ايون النحاسيك الى النحاسوز بوساطة الكيتون المتكون ، من اهم الفحوص التي تثبت انتماء هذه العزلة الى النوع ***Acetobacter xylinum*** (**5**). وعلى هذا الاساس شخصت العزلة المستحصل عليها ***Acetobacter xylinum* FEA 48**. توضح الاشكال (**1 –a** و**b** و**c**) اشكال السيليلوز المنتج من البكتريا قبل التجفيف والشكل المجفف له، اذ ان إنتاج السيليلوز هو احد الخواص المميزة لهذه البكتريا. في حين يوضح الشكل (**1– d**) ألياف السيليلوز للبكتريا المذكورة تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير **400x**.

جدول3 : الخواص المظهرية والفسلجية والكيموحيوية لبكتريا 48 FEA *Acetobacter xylinum* المتميزة في إنتاجها للسيليلوز

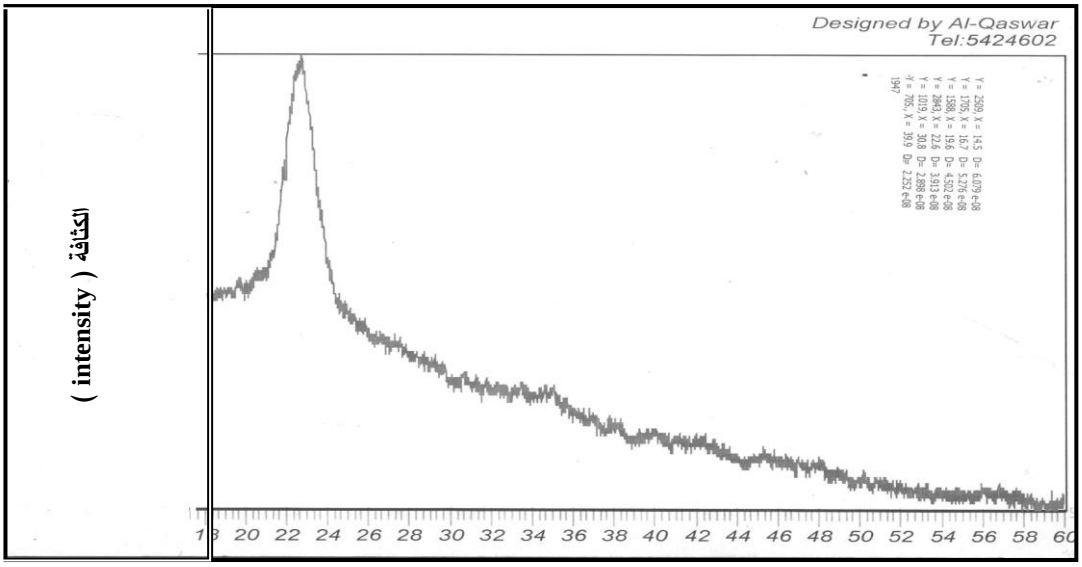
الخواص	نتيجة الفحص	
1. الخواص المزرعية	على الوسط الصلب : * مستعمراتها كريمية اللون * مستديرة الشكل، وذات سطح منتظم، مرتفعة عن سطح الوسط محدبة	على الوسط السائل : * تكوين غشاء رقيق على سطح الوسط * وسط التخمر رائق أي خال من العكارة في نهاية مدة التخمر
2. الخواص المظهرية (المجهرية)	عصوية قصيرة، سالبة لصبغة كرام، خالية من الابواغ، تظهر بصورة مفردة او بشكل ازواج من الخلايا او على شكل سلاسل	
3. الخواص الفسلجية والكيموحيوية	1. فحص الكاتليز	+
	2. فحص الاوكسيديز	–
	3. النمو على وسط Hoyer's medium	–
	4. تكوين حامض وغاز من استهلاك الكلوكوز	+
	5.أكسدة الايثانول إلى CO_2 + ماء	+
	6. إنتاج الصبغات	–
	7. انتاج السليليلوز	+
	8. فحص الحركة	+
	9.إنتاج الكيتونات من الكلسيرول	+
	استهلاك السكريات	
	Glucose	+
	Fructose	+
	Sucrose	+
	Galactose Maltose	+
	Manitole	+
	lactose	–



شكل .1: b, a: الغشاء السيليلوزي المنتج من البكتريا (قبل التجفيف). c: السيليلوز المجفف . d : الياف السيليلوز المنتج تحت المجهر الضوئي وبقوة تكبير 400x .

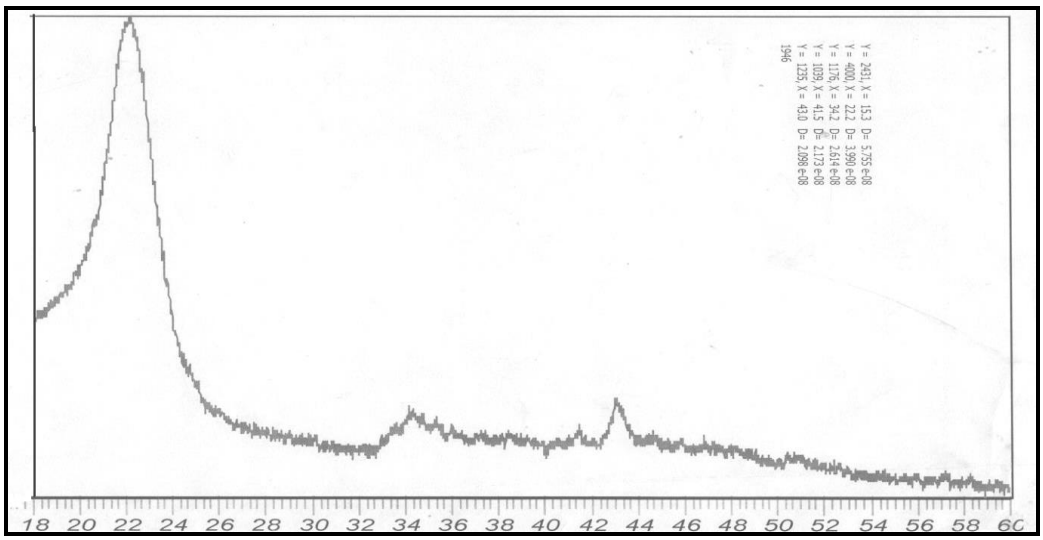
تشخيص السليلوز المنتج بأستخدام X-ray

تم التعرف على درجة بلورة السيليلوز البكتيري المنتج في هذه الدراسة ومقارنتها بدرجة بلورة السيليلوز النباتي بتحليلها بأشعة اكس **X – ray**. فتبين إن قمة نوعي السيليلوز متطابقتان من حيث الظهور عند قيمة **D- spacing** وكانت لنوعي السيليلوز **3.990** ، **3.913** على التوالي (الشكلان **2** و **3**) مما يثبت إن المادة المنتجة في هذه الدراسة هي السيليلوز وليس أي نوع أخر من البوليمرات الكربوهيدراتية الأخرى، لكن أتسمت قمة السيليلوز البكتيري بكونها حادة مقارنة مع قمة السيليلوز النباتي الأمر الذي يقود إلى الاستنتاج إن السيليلوز البكتيري أكثر بلورة من السيليلوز النباتي. ويعود السبب في ذلك إلى احتواء السيليلوز البكتيري على نسبة عالية من السيليلوز **Iα** مقارنة بالنباتي(**10**)و(**11**) مما ينعكس على قيمة معامل البلورة **crystallinity index** للسيليلوز البكتيري فتبدو عالية جدا" إلى الحد الذي يصل به إلى أكثر من **60%** بالاضافة الى ظهور قمة السيليلوز البكتيري عند زاوية (**θ**) **22.7** مما يدلل على انه من النوع المتبلور (**4**) .



الزاوية (**θ 2**)

شكل **2**: فحص **X-ray** للسيليلوزالبكتيري



الزاوية (**θ 2**)

شكل **3** . فحص **X-ray** للسيليلوزالنباتي

المصادر

1- العاني ، صالح خليفة عبد الكريم, (1982).عزل بكتريا حامض الخليك من مصادر محلية ودراسة بعض العوامل المؤثرة على كفائتها في اكسدة الكحول الاثيلي. رسالة ماجستير – قسم الصناعات الغذائية – كلية الزراعة– جامعةبغداد .

2- **Backdahl, H.;G. Helenius; A. Bodin ;U. Nannmark; N. Jonansso ; B. Risberg and P. Gatenhola (2006). Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cell – Biomaterials ,27(9):2141-2149**

3- **Benziman , M. and B. Rrachamimov (1962). Synthesis of Cellulose from succinate – grown cells of *Acetobacter xylinum*. J. Bacteriol., 84:625-630 .**

4- **Bielecki, S.; A. Krystynowicz; M. Turkiewicz and H. Kalinowska. (2005). Bacterial Cellulose In Polysaccharides and polyamides in the food industry: Production and patents. Edited by Al-exdnder Steinb Jchel , Sany Ki Rhee .,p11-20.**

5- **Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons (1974). Bergey, s Manual of Determianative Bacteriology . the Williams and Wilkins company/ Baltimore.,P:162-163.**

6- **Cannon, R. E. and S. M. Anderson (2002). Biogenesis of bacterial cellulose . Crit.Reviews in Microbiol .,17:435-447.**

7- **Ciechanska, D.; H. Kazimiierezak ; K. Guzinska; M. Pawlak; E. Kozlowska ; G. Matusiak and M. Dutkiewicz (2002). New electro-acousitic transducers based on modified bacteriel cellulose . Abstracts, 1(36).**

8- **Emily, A.; C. Sara and F. Payman (2000). General Microbiology Honors , Microbiology at Marylad Mic B 200 H.,P2-3.**

9- **Gibbs, M. B. and A. D. Shapton (1968). Identification Methods for Microbiology, partB, Acamedic press, London and New York.,P10-11. .**

10- **Hutchens, S. (2004). Synthesis and initial characterization of calcuim.deficient hydroxyaptit-bacterial cellulose composite. A thesis presented for the master of Sci. degree, The Univ. of Tennessee,Knoxville,USA.**

11- **Jonas. R. and L. F. Farah (1998). Production and application of mirobial cellulose.Polymer Degrad. Stabil. 59:101-106.**

12- **Kirk, O. (1993). Cellulose. In: Aencyclopedia of chemical Tecnology, 64th Ed.Vol.5,P.476.**

13- **KoBy, T. C. and D. H. Ronald (1974). Fundametal experiments in microbiology. W.B.SANDERS COMPANY. Philadelphia-London, Toronto.,P110-121.**

14- **Lisdiyanti, P.; K.. Katsura; W. Potocharoen; R. Navarrol; Y. yamada; T. Uchimura and K. Komagata(2001). Diversity of acetic acid bacteria. Isolated from south – east Asia sources. (By Int.). www. Brainerd Chemical. Com.**

15- Son, J.; M. Heo; Y. Kim and S. Lee (2001). Optimization of fermentation condition for the production of bacterial cellulose by a newly isolated Acetobacter sp.Aq in shaking cultures. Biotechnol .Appl. Biochem., 33:1-5.
16- Wajdi, A. (1966). Studies on acetic acid bacteria. A thesis for the master degree. Ain shams Univ. Egypt.,P 7-10.
17- Wanichapichart, P.; S. Kaewnopparat; K. BuaKlng and W. Puthoi (2002). Characterization of cellulose membranes produced by Acetobacter xylinum , 24:855-862.
18- Whistler, R. and J. BeMiller (1997). Cellulosics. In Carbohydrate chemistry for food Scientists chapter 7. Eagen Press, St palu, MN.,p201-205.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULOSE PRODUCING BACTERIA *Acetobacter*

M. O. Muhyaddin E. A. El-Shmary A. H. El-Dahhan

ABSTRACT

A total of 60 Isolates belonged to Acetobacter ,were isolated from a local sources and identified depending on cultural ,morphological characteristics and several physiological and biochemical tests .These isolates were subjected to primary screening process to determine their ability to produce cellulose . It was found that 12 isolates were able to produce cellulose.

Physiological and biochemical tests were used to identify these isolates. The most efficient isolate producing cellulose were selected according to quantitve assays the productivity of cellulose was 1.31 g/l . This bacteria was termed *Acetoacter xylinum*

Part of Ph.D. Theses for the second author
College of Sci. -Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.