فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۶، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۱۹- ۳۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۰۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۵/۱۵

جداسازی سویه‌های زانتوموناس لاکتوز مثبت از جمعیت باکتری بیماری‌زای شانکر مرکبات موجود در ایران

اقدس رمضانی: کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، ramezani136_a@yahoo.com
سید مهدی علوی: استادیار زیست‌شناسی سلولی و مولکولی گیاه، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، mealavi@nigeb.ac.ir *
علی هاتف سلمانیان: دانشیار بیوتکنولوژی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، salman@nigeb.ac.ir
محیات جعفری: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، m-jafari@nigeb.ac.ir

چکیده

مقدمه: زانتان هتروپلی‌ساکاریدی است که توسط گروهی از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی از جنس زانتوموناس[1] تولید می‌شود. به طور معمول برای تهیه زانتان از منابع کربنی مثل گلوکز، سوکروز و نشاسته استفاده می‌شود. به علت هزینه‌های بالای فراوری و حمل این منابع کربنی، هزینه نهایی تولید زانتان از منابع اشاره شده بالا می‌رود. به دلیل میزان بیان پایین و در برخی موارد نقص آنزیم بتا گالاکتوزیداز در بسیاری گونه‌های زانتوموناس از جمله زانتوموناس کمپستریس[2]، نمی‌توان از محیط‌های ارزان قیمت سرشار از لاکتوز مثل آب پنیر برای تولید زانتان استفاده نمود. بنابراین، در صورت دسترسی به سویه‌های باکتریایی با قابلیت تجزیه لاکتوز، امکان بهره وری از یک منبع کربنی ارزان قیمت (آب پنیر) برای تولید یک فراورده تجاری ارزشمند (زانتان) فراهم خواهد آمد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، بر روی کلکسیونی متشکل از ۲۱۰ سویه ایرانی *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* جمع آوری شده از باغات مرکبات جنوب ایران مطالعه شد. در ادامه کوشش شد که با استفاده از روش کار مولکولی و تعیین توالی ژن *16S rRNA* این سویه‌ها از جنسیت آن‌ها اطمینان حاصل شود. همچنین، رشد این باکتری‌ها در محیط لاکتوزی بررسی شد.

نتایج: از میان ۲۱۰ سویه مورد مطالعه، ۲۷ سویه قادر به رشد روی محیط غنی از لاکتوز بودند. سپس با تعیین توالی ژن *16S rRNA* این سویه‌ها و تطابق آن با دیگر توالی‌های *16S rRNA* باکتری‌های زانتوموناس موجود در بانک ژنی[3]، از جنسیت این باکتری‌ها اطمینان حاصل شد. همچنین، این باکتری‌ها، دارای رشد قابل قبولی در محیط لاکتوزی بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: در مجموع، می‌توان گفت که سویه‌های زانتوموناس لاکتوز مثبت جدا شده از باغات مرکبات جنوب ایران از قابلیت خوبی در مصرف لاکتوز برخوردار هستند و امید است که در آینده‌ای نزدیک، از این سویه‌های طبیعی در جهت تولید زانتان در محیط‌های ارزان قیمت لاکتوزی مثل آب پنیر بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: زانتوموناس، لاکتوز، زانتان

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

باکتری *Xanthomonas. citri* subsp. *citri* یک باکتری کوکوباسیل گرم منفی از شاخه پروتئوباکترها بوده و عامل بروز بیماری شانکر مرکبات است. این باکتری، میله‌ای شکل بوده و توسط یک تاژه قطبی حرکت می‌کند. زانتوموناس‌ها رنگدانه زردی تولید می‌کنند که مشتق برومی آریل پلی‌ان[۴] است و زانتومونادین نام دارد. این رنگدانه در آب نامحلول و در اتر، نفت، متانول و بنزن قابل حل است (۱). همچنین، این باکتری‌ها یک اگزوپلی‌ساکارید خارج سلولی به نام زانتان تولید کرده که شامل: واحدهای پنتاساکاریدی گلوکز، مانوز و گلوکورونیک اسید با نسبت‌های ۱:۲:۲ است. این پلی‌ساکارید به باکتری ظاهر موکوئیدی داده و علاوه بر این که باکتری را از شرایط نامساعد محیطی (اثرات نور و حمله باکتریوفاژها) محافظت می‌کند، دارای مصارف دارویی، صنعتی، غذایی، شیمیایی و کشاورزی نیز هست (۲ و۳). برای تولید زانتان، باکتری‌های زانتوموناس نیازمند عناصر میکرو و ماکرو به عنوان منابع کربن و نیتروژن هستند. گلوکز و سوکروز، از رایج‌ترین منابع کربن مورد استفاده توسط این باکتری‌ها هستند (۴). با وجود این، به دلیل میزان بیان پایین و در برخی از موارد نقص آنزیم بتا گالاکتوزیداز- آنزیمی که قادر است لاکتوز را به گلوکز و گالاکتوز بشکند- این باکتری قادر به رشد کافی و تولید میزان مناسبی زانتان در محیط‌های پایه‌ای لاکتوز نیستند (۵ و ۶). نخستین بار در سال ۱۹۷۹ ژن کد کننده آنزیم بتاگالاکتوزیداز از باکتری *Xanthomonas campestris* B-1459 استخراج و تعیین صفت شد (۵) و سپس در سال ۱۹۹۵ از باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* همسانه‌سازی شد (۷).

آب پنیر یک محصول فرعی صنایع لبنی است که حاوی ۵۵ درصد از کل مواد شیر از جمله لاکتوز، پروتئین، نمک‌های معدنی و ویتامین‌هاست. دفع آب پنیر به علت سطح بالای نیازش به اکسیژن زیستی، نیاز به پالایش دارد که وقت گیر و پرهزینه است. به همین دلیل و همچنین، به علت محتوای لاکتوز زیاد آن، آب پنیر به عنوان سوبسترایی مناسب برای انواع تخمیر استفاده شده است (۸). اسچوارتزو همکاران[۵] در سال ۱۹۸۵ کوشش کردند که از آب پنیر به عنوان منبع کربن برای تولید زانتان از باکتری *X. campestris* استفاده کنند ولی غلظت کمی از این صمغ به‌دست آمد (۹). بنابراین، کوشش شد تا با همسانه‌سازی ژن بتاگالاکتوزیداز از باکتری‌های دیگر از جمله اشریشیا کلی[۶] و انتقال آن به زانتوموناس و یا ایجاد انواع جهش‌ها در این باکتری‌ها، گونه‌هایی مستعد به استفاده از لاکتوز پیدا کنند. از جمله این آزمایش‌ها می‌توان به مطالعه والش و همکاران[۷] اشاره کرد. والش و همکاران برای انتقال ژن lac z از *E.coli* به *X. campestris* از ترانسپوزون Tn 951 استفاده کردند که در نهایت به بیان بالای ژن بتاگالاکتوزیداز در این سویه منجر شد (۱۰). صعودی و همکاران[۸] در سال ۲۰۰۸ یک سویه بومی زانتوموناس مزارع ایران را به کمک اسید نیترو و به روش جهش‌زایی- انتخاب[۹] جداسازی کردند. فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در شرایط دمایی ۳۸ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۵/۵ حدود ۹/۵ برابر سویه وحشی بود (۱۱).

با وجود این، به نظر می‌رسد هنوز غربال‌گری به منظور دستیابی به سویه‌های طبیعی مصرف کننده لاکتوز از مطلوب‌ترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌ها برای تولید این پلیمر طبیعی با ارزش است.

در پژوهش حاضر، کوشش شد که از بین سویه‌های بومی *Xanthomonas citri* subsp. *citri* موجود در کلکسیون پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری[۱۰]، سویه‌هایی که به طور طبیعی قادر به مصرف لاکتوز باشند جدا شده و از جنسیت آن‌ها اطمینان حاصل شود. در ادامه، مطالعات تکمیلی روی این باکتری در خصوص رشد در محیط‌های لاکتوزی انجام شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی

سویه‌های بومی *Xanthomonas citri* subsp. *citri* از مناطق آلوده به بیماری شانکر باکتریایی مرکبات در استان‌های جنوبی کشور شامل: کرمان، هرمزگان، فارس و سیستان و بلوچستان جداسازی شدند (۱۲).

سویه باکتریایی *Xanthomonas campestris* pv. *campestris DSM1706* به عنوان باکتری شاهد در مقایسه با سویه‌های بومی *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* استفاده شد (۱۳).

از باکتری *E. coli* سویه BL21 به علت دارا بودن اپران کامل لاکتوز به عنوان کنترل مثبت در آزمون‌های غربال‌گری استفاده شد. به منظور انجام نوترکیبی، از سویه DH5αE.coli و همچنین، پلاسمید pTZ57R/T تهیه شده از شرکت فرمنتاز[۱۱] برای همسانه‌سازی و تعیین توالی قطعات تکثیر شده در این باکتری استفاده شد.

کشت باکتری *E. coli* در محیط کشت لوریا برتانی (LB) حاوی ۵ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم سدیم کلرید، ۱۰ گرم تریپتون و ۱۳ گرم آگار در لیتر انجام شد. برای غربال‌گری سویه‌ها در محیط پایه‌ای لاکتوز از محیط رنگی C (C-dye) حاوی ۱ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۰/۵ گرم آمونیوم دی هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم دی پتاسیم فسفات، ۵ گرم سدیم کلرید، ۵ گرم لاکتوز، ۱۲ گرم آگار، ۰/۷ میلی‌لیتر معرف اسیدیته برومو کروزول پرپل[۱۲] (۱/۵ درصد در اتانول) در لیتر استفاده شد. همچنین، محیط کشت مک کانگی آگار (۵۰ گرم پودر خشک در ۱ لیتر آب مقطر) به علت دارا بودن معرف اسیدیته، به منظور تأیید قابلیت مصرف کنندگی لاکتوز در سویه‌های مورد مطالعه، استفاده شد. برای اندازه‌گیری سرعت رشد سلولی از محیط XOLN (محیط +XOL ۰/۰۶۲۵ درصد عصاره مخمر و ۰/۰۶۲۵ درصد تریپتون) دارای ۰/۴ درصد لاکتوز یا گلوکز استفاده شد (۱۴).

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی باکتری به روش *CTAB*[۱۳] استخراج شد (۱۵). به منظور تخلیص پلاسمید در حجم کم[۱۴] از روش لیز قلیایی مطابق سمبروک و همکاران[۱۵]، استفاده شد (۱۶). دو جفت آغازگر با استفاده از نرم افزار ClustalW، برای ژن‌های *16S rRNA* از سویه‌های مختلف *X. campestris* و از طرفی مقایسه آن با *16S rRNA* باکتری *E. coli*، از نواحی کاملاً اختصاصی این ژن در *X.campestris* طراحی شد (۱۳). بررسی مولکولی کلونی‌های نوترکیب با استفاده از واکنش PCR و هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب انجام شد.

نتایج

به منظور غربال‌گری سویه‌های بومی *X. citri* subsp. *Citri* موجود در کلکسیون NIGEB، کشت روی محیط جامد حداقل لاکتوزی و محیط‌های کشت مک کانگی آگار و C-dye (که دارای معرف اسیدیته برای تشخیص باکتری‌های تولید کننده اسید از تخمیر لاکتوز است) انجام شد. تا زمان ظهور کلونی‌ها،

کشت باکتریایی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. چنانچه باکتری‌ها بتوانند از لاکتوز به عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط کشت استفاده کنند، باید در محیط حداقل لاکتوزی قادر به رشد باشند، در محیط مک کانگی آگار، در نتیجه استفاده از لاکتوز و تغییر اسیدیته محیط (به علت تولید لاکتیک اسید) به شکل کلونی‌های ارغوانی ظاهر شوند ودر محیط C-dye نیز رنگ محیط را از بنفش به زرد تغییر دهند. نتایج این آزمون‌ها نشان می‌دهد که از میان ۲۱۰ سویه بومی X. *citri* subsp. *Citri* جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی کشور که در این تحقیق ارزیابی و مطالعه شدند (۱۲)، تعداد ۲۷ سویه قادر به مصرف لاکتوز بوده و شاخص‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی فوق را دارند (جدول ۱).

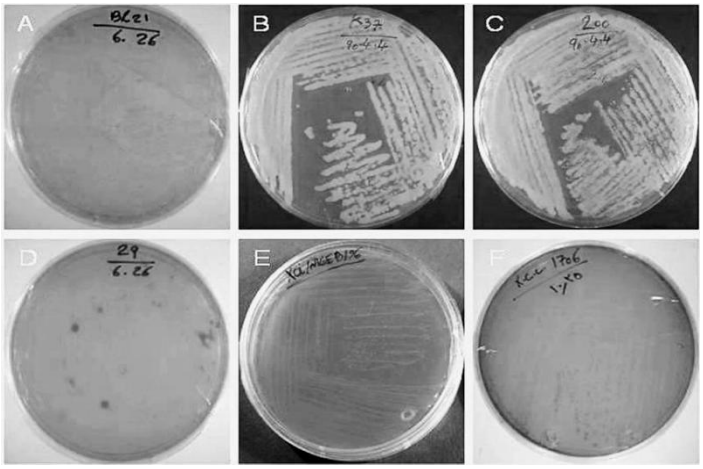
جدول ۱- اطلاعات مربوط به سویه‌های *Xanthomonas citri* subsp. *citri* مصرف کننده لاکتوز موجود در NIGEB

سویه باکتریایی	سال جمع‌آوری	منشا بیولوژیک و میزبان	منشا جغرافیایی				مدت زمان واکنش پس از کشت روی محیط C.dye (ساعت)		طول زمان تخمیر
			کرمان	هرمزگان	فارس	سیستان و بلوچستان	شروع	پایان	
NIGEB-041	خرداد ۱۳۸۷	برگ[۱۶] *C. a.*	رضا آباد				۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-056	خرداد ۱۳۸۷	برگ *C. a.*		رودان			۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-068	خرداد ۱۳۸۷	برگ *C. a.*		رودان			۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-072	خرداد ۱۳۸۷	برگ *C. a.*		سرکهنان			۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-095	خرداد ۱۳۸۷	برگ *C. a.*		هشتبندی			۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-120	خرداد ۱۳۸۷	برگ *C. a.*			افزر		۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-133	خرداد ۱۳۸۷	برگ *C. a.*			جهرم		۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-140	خرداد ۱۳۸۷	برگ *C. a.*			جهرم		۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-152	خرداد ۱۳۸۷	برگ *C. a.*			جهرم		۴۸	۹۶	۴۸
NIGEB-156	خرداد ۱۳۸۷	برگ *C. a.*			جهرم		۴۸	۹۶	۴۸
NIGEB-196	دی ۱۳۸۸	برگ *C. a.*				سرباز	۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-197	دی ۱۳۸۸	برگ *C. a.*				سرباز	۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-198	دی ۱۳۸۸	برگ *C. a.*				سرباز	۲۴	۹۶	۷۲
NIGEB-199	دی ۱۳۸۸	برگ *C. a.*				سرباز	۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-200	دی ۱۳۸۸	برگ *C. a.*				سرباز	۲۴	۴۸	۲۴
NIGEB-201	دی ۱۳۸۸	برگ *C. a.*				سرباز	۲۴	۴۸	۲۴
NIGEB-203	دی ۱۳۸۸	برگ *C. a.*				سرباز	۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-204	اردیبهشت ۱۳۸۹	برگ *C. a.*				سرباز	۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-205	اردیبهشت ۱۳۸۹	برگ *C. a.*				سرباز	۲۴	۴۸	۲۴
NIGEB-206	فروردین ۱۳۸۹	برگ *C. a.*		چاه زیارت			۲۴	۴۸	۲۴
NIGEB-207	اردیبهشت ۱۳۸۹	برگ *C. a.*				نیک شهر	۲۴	۷۲	۴۸

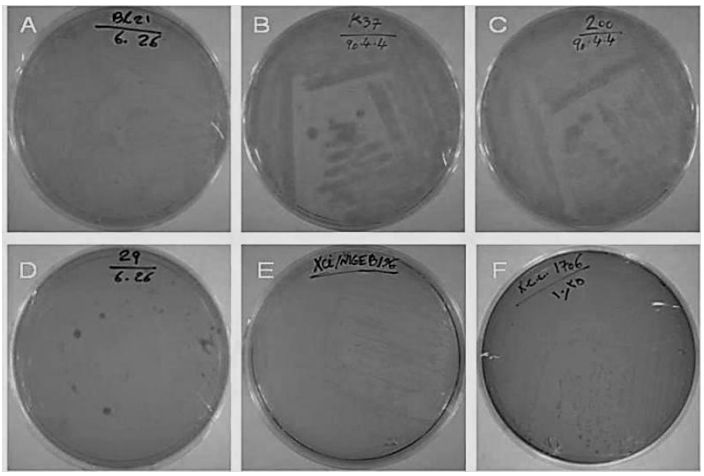
ادامه جدول ۱:

سویه باکتریایی	سال جمع‌آوری	منشا بیولوژیک و میزبان	منشا جغرافیایی				مدت زمان واکنش پس از کشت روی محیط C.dye (ساعت)		طول زمان تخمیر
			کرمان	هرمزگان	فارس	سیستان و بلوچستان	شروع	پایان	
NIGEB-208	اردیبهشت ۱۳۸۹	برگ *C. a.*		رودان (بند ملا)			۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-209	اردیبهشت ۱۳۸۹	برگ *C. a.*		رودان (بند ملا)			۲۴	۴۸	۲۴
NIGEB-K32	آبان ۱۳۷۹	برگ *C. a.*		رودان (بند ملا)			۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-K37	آبان ۱۳۷۹	برگ *C. a.*		میناب			۲۴	۴۸	۲۴
NIGEB-K48	آبان ۱۳۷۹	برگ *C. a.*				ایرانشهر	۲۴	۷۲	۴۸
NIGEB-K56	آبان ۱۳۷۹	برگ *C. a.*				ایرانشهر	۲۴	۷۲	۴۸

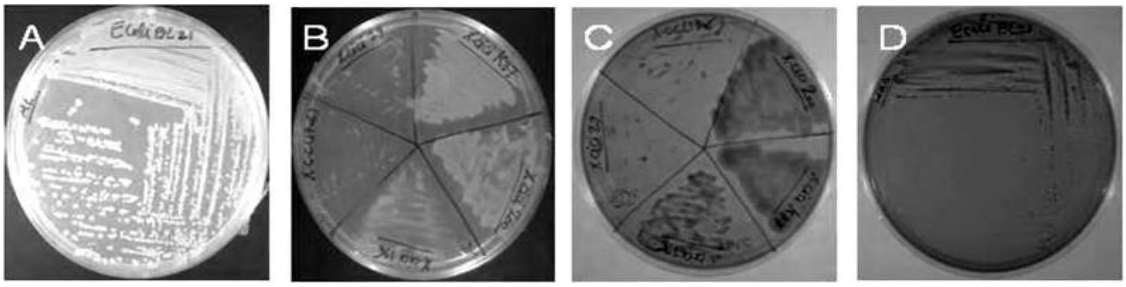
از میان ۲۷ سویه مصرف کننده لاکتوز، ۳ سویه NIGEB-K37، NIGEB-200 (سریع رشد) و NIGEB-196 (متوسط رشد) به شکل کاملا اتفاقی برای ادامه کار و انجام آزمایش‌های بیشتر انتخاب شدند. نتایج این غربال‌گری برای این ۳ سویه در شکل‌های ۱ تا ۳ آمده است.



شکل ۱- کشت سویه‌های باکتریایی در محیط *C-dye* پس از ۲۴ ساعت. *A*: سویه *E. coli BL21* به عنوان کنترل لاکتوز مثبت، *B*: سویه ایرانی *NIGEB-K37*، *C*: سویه ایرانی *NIGEB-200*، *D*: سویه ایرانی *NIGEB-029*، *E*: سویه ایرانی *NIGEB-196*، *F*: سویه *DSM1706* به عنوان کنترل لاکتوز منفی



شکل ۲- کشت سویه‌های باکتریایی در محیط *C-dye* پس از ۴۸ ساعت. *A*: سویه *E. coli BL21* به عنوان کنترل لاکتوز مثبت، *B*: سویه ایرانی *NIGEB-K37*، *C*: سویه ایرانی *NIGEB-200*، *D*: سویه ایرانی *NIGEB-029*، *E*: سویه ایرانی *NIGEB-196*، *F*: سویه *DSM1706* به عنوان کنترل لاکتوز منفی



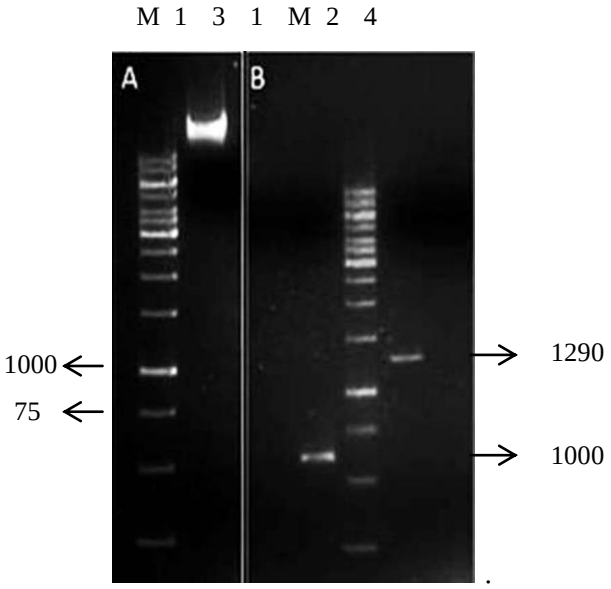
شکل ۳- کشت سویه‌های باکتریایی در محیط حداقل لاکتوزی و مک کانگی آگار پس از ۲۴ ساعت.*A*: سویه *E. coliBL21* به عنوان کنترل لاکتوز مثبت روی محیط حداقل لاکتوزی، *B*: سویه‌های ایرانی *NIGEB-K37*، *NIGEB-200*، *NIGEB-029*، *NIGEB-196* و سویه *DSM1706* به عنوان کنترل لاکتوز منفی روی محیط حداقل لاکتوزی، *C*: سویه‌های ایرانی *NIGEB-K37*، *NIGEB-200*، *NIGEB-029*، *NIGEB-196* و سویه *DSM1706* به عنوان کنترل لاکتوز منفی روی محیط مک کانگی آگار، *D*: سویه *E. coli BL21* به عنوان کنترل لاکتوز مثبت روی مک کانگی آگار

همان‌طور در شکل‌های ۱ تا ۳ ملاحظه می‌شود، سویه‌های ایرانی NIGEB-K37، NIGEB-200 و NIGEB-196 به علت قابلیت مصرف لاکتوز توانسته‌اند رنگ محیط C-dye و مک کانگی آگار را تغییر داده و در محیط حداقل لاکتوزی رشد کنند.

تأیید مولکولی باکتری‌های انتخاب شده بر مبنای *16S rRNA*

به منظور کسب اطمینان از تعلق سویه‌های لاکتوز مثبت به جنس زانتوموناس، به تکثیر، همسانه‌سازی و ردیف‌یابی بخشی از ژن *16S rRNA* یکی از سویه‌های مورد مطالعه اقدام شد. پس از استخراج DNA و تعیین کیفیت DNA سویه NIGEB-K37 (شکل ۴A)، به تکثیر ژن *16S rRNA* به کمک جفت آغازگرهای اختصاصی Xcc16SF1/R1 و Xcc16SF2/R2 اقدام شد (۱۳). در این واکنش، از DNA باکتری *E. coli* به عنوان الگوی واکنش کنترل منفی PCR استفاده شد (شکل ۴B). چنانچه از شکل ۴B برمی‌آید، هر دو جفت آغازگرهای اختصاصی قادر به تکثیر ناحیه هدف از ژنوم سویهNIGEB-K37 بوده‌اند. تکثیر ژنوم مذکور با

آغازگرهای Xcc16SF1/R1، تولید قطعه‌ای به طول ۶۱۱ جفت باز و با استفاده از آغازگرهای Xcc16SF2/R2 تولید قطعه‌ای به طول ۱۲۹۰ جفت باز نموده است. سپس، با استفاده از آغازگرهای استاندارد M13 به تعیین ترادف نواحی تکثیر شده ژن *۱۶S* rRNA سویه مذکور اقدام شد.

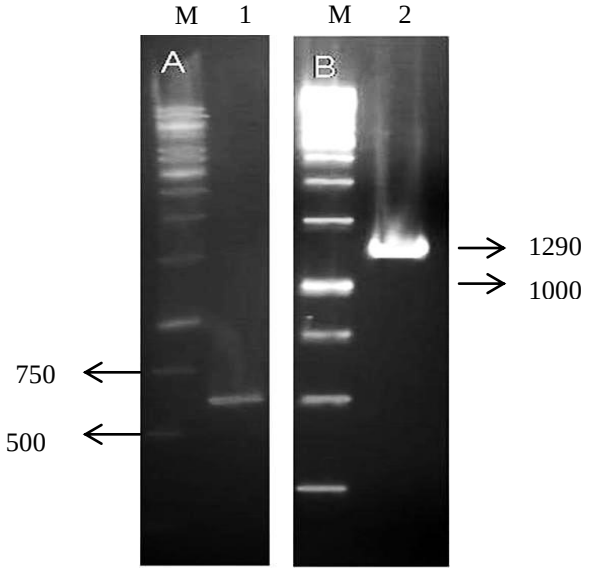


شکل ۴- A: سنجش کیفی *DNA* استخراج شده از سویه *NIGEB-K37* با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸درصد ؛ نشانگر اندازه 1kb (خط M) و ژنوم سویه باکتریایی (خط ۱)؛
B: سنجش فراورده PCR ژن *۱۶S rRNA* روی ژل آگاروز ۱درصد؛ با استفاده از آغازگرهای Xcc16SF1/R1 (خط ۱)، Xcc16SF2/R2 (خط ۲)، فراورده PCR ژنوم سویه باکتریایی *E.coli* DH5α (کنترل‌های منفی) به کمک آغازگرهای Xcc16SF1/R1 و Xcc16SF2/R2 (خط‌های ۳ و ۴) و نشانگر اندازه *1kb* (خط *M*). اندازه چند نوار DNA در حاشیه شکل نشان داده شده است

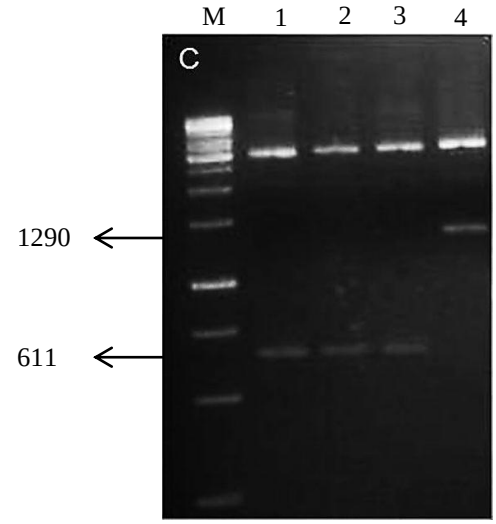
همچنین، به منظور تعیین ترادف بخشی از ژن *۱۶S* rRNA در سویه NIGEB-K37 به نمایندگی از جمعیت بومی سویه‌های باکتریایی عامل بیماریزای شانکر مرکبات، آمپلیکون‌های حاصل از جفت آغازگرهای Xcc16SF1/R1 (به طول ۶۱۱ جفت باز) و Xcc16SF2/R2 (به طول ۱۲۹۰ جفت باز) در pTZ57R/T همسانه‌سازی شدند.

هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب

به منظور اطمینان از انجام عمل نوترکیبی، به تکثیر پلاسمیدهای نوترکیب درون میزبان باکتریایی *E. coli* DH5α (شکل ۵A, B) (۵) اقدام شد. همچنین، به منظوراطمینان بیشتر از ورود قطعات هدف به داخل پلاسمید pTZ57R/T و جایگیری مناسب آن‌ها در این ناقل ژنی، به هضم آنزیمی نوترکیب‌ها با استفاده از دو آنزیم برشی SacI و BamHI اقدام شد. جایگاه برش آنزیم SacI در فرادست و جایگاه برش آنزیم BamHI در فرودست جایگاه ورود قطعه *۱۶S rRNA* است. در صورت همسانه‌سازی قطعه مورد نظر، انتظار می‌رود که پس از هضم آنزیمی، قطعاتی در حدود ۱۲۹۰ و ۶۱۱ جفت باز از پلاسمید خارج شود (شکل C ۵).



شکل ۵A, B- قطعات حاصل از پلاسمیدهای نوترکیب. A و B: قطعات حاصل از PCR با آغازگرهای Xcc16SF1/*R1* (خط ۱) و آغازگرهای Xcc16SF2/*R2* (خط ۲)



شکل 5A, B- قطعات حاصل از هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاوی قطعه ۶۱۱ جفت باز (خط ۱، ۲ و ۳)، و پلاسمید حاوی قطعه ۱۲۹۰ جفت باز (خط ۴) خط M در هر سه شکل A، B و C بیانگر نشانگر اندازه یک کیلوباز است.

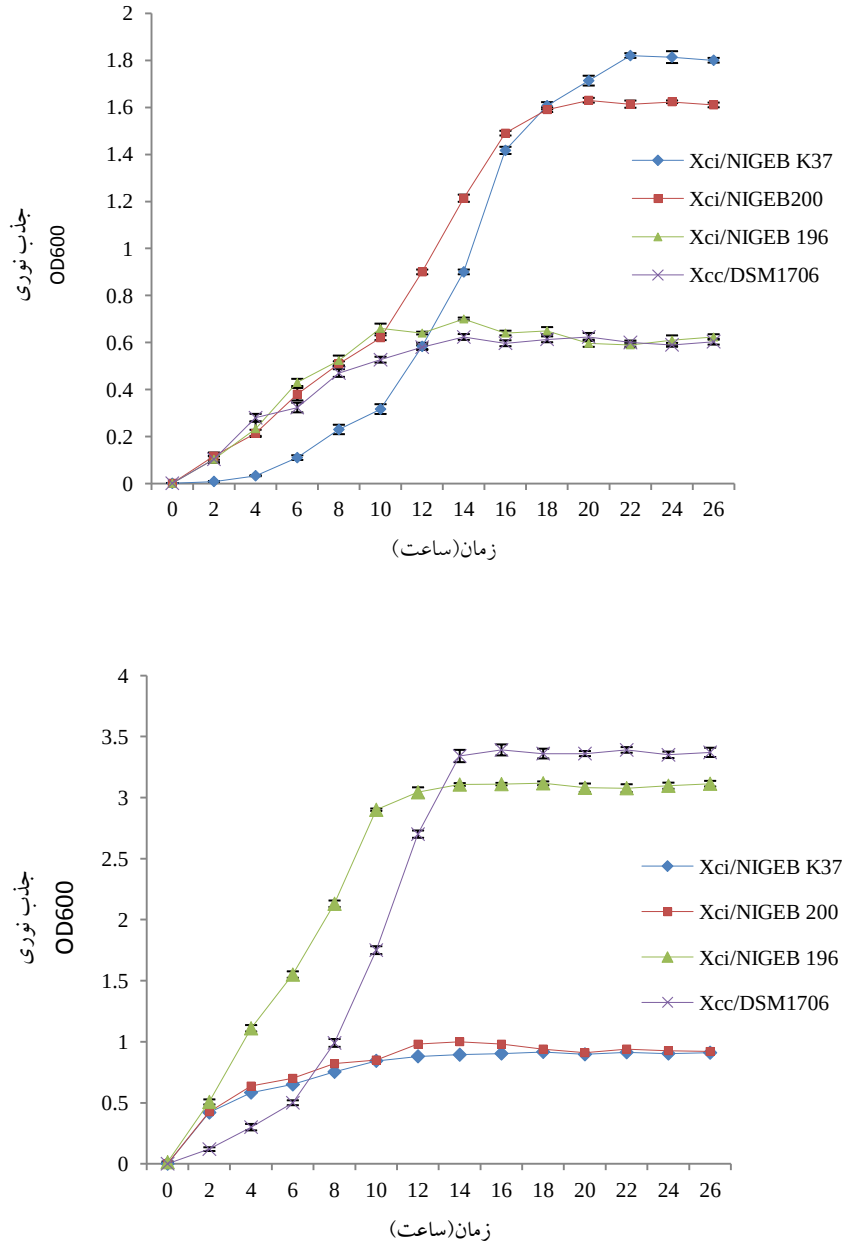
ردیف یابی ناقص ژن *16S rRNA*

ناقل pTZ57R/T به دلیل داشتن دو جایگاه اتصال برای آغازگرهای استاندارد رفتی و برگشتی M13 به ترتیب در دو سمت فرادست و فرودست ژن‌های همسانه‌سازی شده درمحل‌های چند گانه همسانه‌سازی (Multiplecloning site, MCS)، امکان تعیین توالی ژن مربوطه را فراهم می‌سازد. بنابراین، برای آگاهی از ترادف ژنی کلون‌های نوترکیب، از این جفت آغازگر استفاده شد. به منظور آگاهی از تشابهات احتمالی توالی ذکر شده با داده‌های موجود در بانک‌های ژنی، تحلیل Blastn انجام شد. نتایج به دست آمده گویای در صد بالای تشابه ۹۷ درصد ژن *16S rRNA* سویه بومی NIGEB-K37 با توالی‌های مشابه در جنس زانتوموناس است. این توالی نوکلئوتیدی تحت شماره JN039034 در NCBI به ثبت رسیده است.

مقایسه منحنی رشد باکتری‌های *X. citri* subsp. *Citri* و *X. campestris* pv. *campestris*DSM1706 در محیط‌های حاوی قند گلوکز و لاکتوز

به منظور بررسی میزان رشد سویه‌های غربال شده X. *citri* subsp. *Citri* روی محیط‌های حاوی لاکتوز و گلوکز در قیاس با سویه شاهد استاندارد X. *campestris* pv. *campestris* DSM1706، در محیط XOLN+ ۰/۴ درصد لاکتوز و XOLN+ ۰/۴ درصد گلوکزو تحت شرایط دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه رشد داده شد. سپس، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) در بازه‌های زمانی ۲ ساعته از زمان صفر تا ۲۶ ساعت قرائت شد. همان طورکه از نتایج شکل ۶ بر می‌آید، سویه‌های NIGEB-K37 و NIGEB-200 در محیط حاوی لاکتوز (A) دارای منحنی رشد مطلوبی هستند. بر این اساس، هر دو سویه پس از حدود ۲ ساعت وارد فاز لگاریتمی شده و پس از گذشت زمان تقریبی ۲۲ (در مورد NIGEB-K37) و ۲۰ ساعت (در مورد NIGEB-200) وارد فاز ثابت رشد می‌شوند (به ترتیب با جذب نوری ۱/۹۱۷ و ۱/۶۸۱). در همین حال، از نتایج شکل (A) چنین استنباط می‌شود که سویه‌های NIGEB-196 و DSM1706 از رشد مطلوبی در محیط‌های حاوی لاکتوز برخوردار نبوده است به طوری که پس از حدود ۱۴ ساعت به حداکثر رشد (به ترتیب با جذب نوری ۰/۷ و ۰/۶۱) رسیده و پس از آن در فاز ثابت رشد باقی می‌مانند. بر اساس نتایج این تحقیق، رفتار سویه‌های مذکور در محیط حاوی گلوکز کاملا متفاوت بوده به طوری که در مقایسه با محیط حاوی لاکتوز، می‌توان یک روند معکوس را در خصوص این سویه‌ها مشاهده نمود. در این حالت سویه‌های NIGEB-K37 و

NIGEB-200 پس از شروع فاز لگاریتمی رشد در زمان ۱۴ ساعت، به سرعت حداکثر فاز رشدی نزدیک شده و منحنی رشد آن‌ها در جذب نوری OD_{600} در ۰/۹ و ۱ ثابت می‌شود. بر خلاف این دو سویه لاکتوز مثبت، سویه بومیNIGEB-196 و سویه شاهد DSM1706 در محیط گلوکزی از روند رشد مطلوبی برخوردار هستند. این دو سویه پس از استقرار در محیط کشت (کمتر از یک ساعت) وارد فاز لگاریتمی شده و در زمان ۱۴ ساعت به حداکثر رشد خود (به ترتیب با جذب نوری ۳/۱ و ۳/۳) می‌رسند.



شکل ۶- مقایسه منحنی رشد سویه‌های بومی *NIGEB-K37*، *NIGEB-200* و *NIGEB-196* و سویه شاهد *DSM1706*. *A*: محیط *XOLN+* ۰/۴ درصد لاکتوز *B*: محیط *XOLN+* ۰/۴ درصد گلوکز

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های جنس زانتوموناس به دلیل تولید اگزوپلی‌ساکاریدی به نام زانتان، در بسیاری از صنایع بالا دستی مثل نفت و دارو و همچنین، صنایع پایین دستی مثل صنایع غذایی کاربرد دارد. این پلی‌ساکارید ظاهری موکوئیدی به باکتری داده و باکتری را از شرایط نامساعد محیطی محافظت می‌کند. همچنین، به علت خاصیت رئولوژیکی و پایداری آن در محدوده وسیعی از حرارت و اسیدیته، به عنوان عامل معلق‌کننده، غلیظ کننده و پایدارکننده در غذاها به کار رفته و ویسکوزیته نهایی غذا را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد. علاوه بر این، در صنایع شیمیایی به عنوان پایدارکننده رنگ‌ها، در صنایع سرامیک به عنوان معلق‌کننده ذرات سنگین، اصلاح‌کننده جریان در لوازم آرایشی و خمیر دندان‌ها و همچنین، در صنایع نفت، در مایعات حفاری چاه و پاکسازی خطوط لوله کاربرد دارد (۳). در تهیه زانتان، از کشت این باکتری‌ها در محیط‌هایی با منابع کربنی سوکروز، گلوکز و نشاسته استفاده می‌شود (۴) ولی تولید آن در مقیاس صنعتی با استفاده از منابع کربن ارزان قیمتی مثل ملاس چغندر و آب پنیر نیز امکان پذیر است. از دیگر سو، به دلیل میزان بیان پایین و در برخی از موارد نقص آنزیم بتاگالاکتوزیداز در باکتری‌های جنس زانتوموناس، استفاده از لاکتوز به عنوان منبع کربن در محیط‌های کشت امکان پذیر نیست (۵). با این اوصاف، بدیهی است که دستیابی به سویه‌های لاکتوز مثبت طبیعی یا دست ورزی ژنتیکی سویه‌های تجاری برای کسب قابلیت رشد در محیط‌های لاکتوزی و بهره‌مندی از ضایعات صنایع غذایی (مثل آب پنیر) در تولید زانتان می‌تواند از نظر اقتصادی دارای مزیت نسبی مطلوبی باشد. آب پنیر به علت سطح بالای نیاز زیستی به اکسیژن مشکلات زیادی را برای محیط زیست به وجود می‌آورد. بهترین شیوه برای خارج کردن آب پنیر از چرخه تولید محصولات لبنی، استفاده از آن به عنوان سوبسترا در تولید محصولات با ارزش صنعتی مانند زانتان است. تحقق این امر در گرو برخورداری سویه‌های زانتوموناس از قابلیت (طبیعی یا مصنوعی) مصرف لاکتوز است.

برای تولید مصنوعی چنین سویه‌هایی می‌توان از روش‌های مهندسی ژنتیک استفاده نمود (۱۷). با وجود این، موانع متعددی ممکن است سودمندی چنین فرآیندی را تحت تاثیر قرار دهد. به طور مثال ممکن است پایداری ژن خارجی در سلول میزبان با مشکل مواجه شده و یا سویه مهندسی شده از نظر زیست محیطی و قوانین ایمنی زیستی با خطر مواجه شود (۱۸). اما، دستیابی به سویه‌هایی که قادر باشند به طور طبیعی و با استفاده از منابع کربنی ارزان قیمت به تولید زانتان بپردازند می‌تواند به ایجاد مزیت نسبی در تولیدات صنعتی وابسته به مصرف زانتان منجر شود؛ به طوری که با اختصاص منابع اولیه ارزان بتوان به تولید محصولات با ارزش اقتصادی بالا اقدام کد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که سویه‌های غربال شده از جمعیت بومی باکتری‌های بیماری زای شانکر مرکبات، توانایی خوبی در استفاده از منبع کربنی لاکتوز دارند.

در این پژوهش، کوشش شد تا از میان ۲۱۰ سویه ایرانی باکتری *X. citri* subsp. *Citri* موجود در کلکسیون پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (NIGEB) که از استان‌های کرمان، هرمزگان، فارس و سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شده بودند، سویه‌هایی که به طور طبیعی قادر به مصرف لاکتوز باشند جداسازی شده و از رشد آن‌ها در محیط‌های غنی

از لاکتوز اطمینان حاصل شود. به منظور غربال‌گری، سویه‌های مورد مطالعه ابتدا روی محیط لاکتوزی دارای معرف اسیدیته (C-dye) کشت شد. داده‌های به دست آمده (نتایج نشان داده نشده اند) گویای وجود تنوع در سرعت تغییر رنگ محیط در میان این سویه‌هاست. این امر، شاید در اثر تفاوت‌هایی است که در بیان و فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز سویه‌های مورد مطالعه در شرایط مورد آزمون رخ می‌دهد. شاید بتوان چنین استنباط کرد که سویه‌هایی که در مدت زمان کمتری رنگ محیط را تغییر داده‌اند دارای فعالیت بالاتری از آنزیم بتا گالاکتوزیداز بوده و یا بیان بالاتری از این آنزیم دارند و در نتیجه، قابلیت بهتری در استفاده از لاکتوز به عنوان منبع کربنی داشته باشند. این ادعا از آن‌جا نشات می گیرد که سویه شاهد DSM1706 فعالیت مطلوبی از نقطه نظر آنزیم بتا گالاکتوزیداز از خود بروز نمی‌دهد و همان‌طور که نشان داده شده است، این موضوع به نقص ژنتیکی این سویه در تولید آنزیم مذکور مربوط می‌شود.

نتایج تکمیلی حاصل از رشد سویه‌های هدف روی محیط لاکتوزی دارای معرف اسیدیته مک کانگی آگار و نیز رشد روی محیط حداقل لاکتوز بار دیگر تأییدی است بر قابلیت سویه‌های بومی باکتری بیماری‌زای شانکر مرکبات در مصرف لاکتوز به عنوان منبع کربن (شکل ۳). این موضوع، همچنین، بیانگر ضعف سویه شاهد در بکارگیری این منبع کربنی است. البته، نباید از نظر دور داشت که برخی سویه‌های انتخابی از کلکسیون NIGEB، مثل NIGEB-196 نیز همانند سویه شاهد از قابلیت کمی در مصرف لاکتوز برخوردار هستند (شکل ۶). برای فهم دقیق از میزان فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سویه‌های بومی، نیاز به روش‌های سنجش آنزیمی و نیز مطالعه میزان بیان ژن‌های اپران لاکتوز با روش‌های کمی مثل PCRReal Time- و یا وسترن بلاتینگ است.

نتایج این تحقیق، همچنین، نشان می‌دهد که در محیط گلوکزی، دو سویه NIGEB-196 و DSM1706 دارای رشد بیشتری نسبت به سویه‌های NIGEB-K37 و NIGEB-200 هستند که نشان دهنده قابلیت بهتر آن‌ها در استفاده ازگلوکز است. این امر نشان می‌دهد که اگرچه NIGEB-196 می‌تواند از منبع کربن لاکتوز استفاده کند (هرچند خیلی ضعیف) ولی برای استفاده از گلوکز بسیار توانمندتر است. در مورد سویه شاهد DSM1706 همان‌طور که انتظار می‌رفت، گلوکز به عنوان منبع کربن بسیار خوب برای این باکتری محسوب شده و در این محیط رشد مطلوبی نشان می‌دهد. در محیط لاکتوزی مشخص شد که دو سویه NIGEB-K37 و NIGEB-200 قابلیت خوبی در استفاده از لاکتوز دارند.

References

(1) Poplawsky A, Urban S, Chun W. Biological role of Xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. campestris. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (12): 5123–7.

(2) Garcia-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gomez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol Adv* 2000; 18 (7): 549–79.

(3) Lachke A. Xanthan—a versatile gum. *Resonance* 2004; 9 (10): 25–33.

(4) Kennedy JF, Bradshaw IJ. Production, properties and applications of xanthan. *Prog Ind Microbil*1984; 19: 319-71.

(5) Frank JF, Somkuti GA. General properties of beta-galactosidase of *Xanthomonas campestris*. *Appl Environ Microbiol* 1979; 38 (3): 554-6.

(6) Yang TC, Wu GH, Tseng YH. Isolation of a *Xanthomonascampestris* strain with elevated beta-galactosidase activity for direct use of lactose in xanthan gum production. *Lett appl microbiol* 2002; 35 (5): 375–9.

(7) Taron CH, Benner JS, Hornstra LJ, Guthrie EP. A novel beta-galactosidase gene isolated from the bacterium *Xanthomonas manihotis* exhibits strong homology to several eukaryotic beta-galactosidases. *Glycobiol* 1995; 5 (6): 603-10.

(8) Pesta G, Meyer-Pittroff R, Russ W. Utilization of whey. In: Oreopoulou V, Russ W, volume editors. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. 3th vol. New York: Springer US; 2007.

(9) Schwartz RD, Bodie EA. Production of high-viscosity whey broths by lactose utilizing *Xanthomonas campestris* strain. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50 (6): 1483-5.

(10) Walsh PM, Haas MJ, Somkuti GA. Genetic construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris*. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47 (2): 253-7.

(11) Ashraf S, Soudi MR, Sadeghizadeh M. Isolation of a novel mutated strain of *Xanthomonas campestris* for xanthan production using whey as the sole substrate. *Pakistan journal of biological sciences* 2008; 3 (11): 438 –42.

(12) Soltaninejad H.The detecting of genetic variation among Iranian strains of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*, casual agent of bacterial citrus canker [Dissertation]. Tehran: science and research branch of Islamic univ.; 2010.

(13) Jafari M. Transformation of Lactose Operon to *Xanthomonas campestris* DSM1706 with a Mini-Mu Derivative and Study Beta-Galatosidase Activity in Transformed Bacteria [Dissertation]. Tehran: Alzahra Univ.; 2009.

(14) Yang TC, Wu GH, Tseng YH. Isolation of a *Xanthomonas campestris* strain with elevated beta-galactosidase activity for direct use of lactose in xanthan gum production. *Lett Appl Microbiol* 2002; 35 (5): 375–9.

(15) Winnepenninckx B, Bockeljau T, De-Wachter R. Extraction of high molecular weight DNA from mollucs. *Trends in Genetics* 1993; 12 (9): 407-8.

(16) Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NK; 2001.

(17) Vizváryová M, Valková D. Transposons-the useful genetic tools. *Biologia – bratislav a*2004; 59 (3): 309–18.

(18) *Yang TC, Hu RM, Hsiao YM, Weng SF, Tseng YH. Molecular Genetic Analyses of Potential beta-Galactosidase Genes in Xanthomonas campestris. J Molecul Microbiol Biotechnol* 2003; 6 (3-4): 145–54.

---

[1]. *Xanthomonas*
[2]. *Xanthomonas campestris*
[3]. *Genbank*
[4]. Brominated aryl-polyene
[5]. Schwartz et al.
[6]. Escherichia coli (*E. coli*)
[7]. Walsh et al.
[8]. Soudi et al.
[9]. mutation-selection
[10]. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)
[11]. Fermentase
[12]. Bromocresol purple (1.5% Et.OH)
[13]. hexadecyl trimethyl ammonium bromide
[14]. Mini- Preparation
[15]. Sambrook et al.

The screening of xanthomonas lactose – positive strains among bacterial populations of citrus canker disease isolated from Iran

Aghdas Ramezani
M.Sc. of Cellular and molecular biology, National institute of genetic engineering and biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, ramezani136_a@yahoo.com
Seyed Mehdi Alavi *
Assistant professor of Plant cellular and molecular biology, National institute of genetic engineering and biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, mealavi@nigeb.ac.ir
Ali Hatef Salmanian
Associate professor of Biotechnology, National institute of genetic engineering and biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, salman@nigeb.ac.ir
Mahyat Jafari
M.Sc. of Microbiology, National institute of genetic engineering and biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, m-jafari@nigeb.ac.ir

Abstract

Introduction: Xanthan is a heteropolysaccharide that is produced by the group of plant pathogen bacteria from Xanthomonas genus. Usually, the media containing glucose, sucrose and starch is used for xanthan production. Because their preparation and transferring is expensive, the final cost of xanthan production by these carbon sources is high. On the other hand, many Xanthomonas species such as X.campestris are not able to use cheap media rich of lactose such as whey to produce xanthan due to the low expression and sometimes the defect of their β-galactosidase enzyme. The access to bacterial strains capable of decomposing lactose will provide a possibility for producing a valuable commercial product (xanthan) from an inexpensive carbon source (whey).

Materials and methods: In the present study, a collection containing 210 isolated Xanthomonas citrisubsp.citri Iranian strains from citrus orchards in south Iran was studied. Then, the genus of these bacteria was determined by using molecular techniques and sequencing of 16S-rDNA gene. Also, their growth in lactose – based medium was investigated.

Results: Among 210 strains, 27 strains were able to grow on lactose rich medium. Then, the genus of these bacteria was proved by sequencing of 16S-rDNA gene and comparison with another 16S-rDNA gene sequences existing in NCBI. Also, these bacteria had considerable growth in lactose-based medium.

Discussion and conclusion: At last, we can say that separated lactose-positive Xanthomonas strains from southern citrus orchards have good ability to utilize lactose and in the near future, it would be possible to apply these native strains for xanthan production in cheaper lactose media such as whey.

Key words*:* Xanthomonas, Lactose, Xanthan

* Corresponding Author
Received: April 22, 2013 / **Accepted:** August 6, 2013