فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۷، پاییز ۱۳۹۲، صفحه ۶۹- ۷۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۳

بهینه‌سازی تولید پلی‌فسفات توسط *باسیلوس مگاتریوم* سویه G11

سارا قشقایی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، ghashghaei.sara@yahoo.com
گیتی امتیازی: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، emtiazi@yahoo.com *

چکیده

مقدمه: پلی‌فسفات‌ها که دانه‌های ولوتین نیز نامیده می‌شوند، بسپارهای خطی از ارتوفسفات‌های اتصال یافته با پیوندهای پرانرژی فسفوانهیدریدی هستند که در باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها، گیاهان و جانوران مشاهده می‌شوند. این بسپار به‌طور کامل ایمن و غیرسمی است و کاربردهای متعددی در صنایع غذایی و دارویی دارد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق به علت اهمیت بالای این بسپارها در صنایع مختلف، چندین عامل مانند نوع منبع کربن، غلظت منبع کربن و غلظت فسفر برای افزایش تولید پلی‌فسفات در *باسیلوس مگاتریوم* سویه G11 مطالعه و بهینه شدند. این کار با تعیین مقدار فسفر حذف شده از محیط و میزان پلی‌فسفات ذخیره شده در سلول انجام شد. برای اثبات معنی‌دار بودن نتایج به‌دست آمده، از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک طرفه و توکی استفاده شد.

نتایج: رشد *باسیلوس مگاتریوم* در حضور سوکروز (جذب نوری ۳/۰۲۶) بهتر از گلوکز (جذب نوری ۲/۶۱۶) بود ولی فعالیت سلولی از لحاظ تولید پلی‌فسفات و حذف فسفر، در محیط گلوکز بیشتر و به‌ترتیب برابر با ۰/۰۳۳ گرم بر گرم وزن خشک توده سلولی و ۱/۶۱ گرم بر لیتر بود. به‌علاوه تولید پلی‌فسفات و حذف فسفر در راستای هم، با افزایش غلظت گلوکز محیط، کاهش یافتند. در بررسی اثر فسفر دو مرحله بالارونده و پائین‌رونده مشاهده شد. افزایش غلظت فسفر از ۰/۲۵ تا یک گرم بر لیتر موجب افزایش تولید پلی‌فسفات و حذف فسفر از محیط شد درحالی‌که افزایش بیشتر غلظت فسفر، یعنی از یک تا چهار گرم بر لیتر موجب کاهش آن‌ها شد. براساس اطلاعات به‌دست آمده از تحلیل واریانس یک طرفه و توکی، در کل اختلاف آماری معنی‌داری ($P<0/01$) در تولید پلی‌فسفات و حذف فسفر از محیط در هر مرحله از بهینه‌سازی وجود داشت. در نهایت می‌توان گفت برای این سویه بهترین غلظت گلوکز و نمک دی‌پتاسیم فسفات برای تولید پلی‌فسفات به ترتیب برابر با ۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر است.

بحث و نتیجه‌گیری: مطابق با داده‌های به‌دست آمده، بهترین منبع کربن برای رشد و تکثیر سلول، بهترین منبع کربن برای تولید پلی‌فسفات و حذف فسفر از محیط نیست. از آنجایی‌که برای تولید پلی‌فسفات بین غلظت‌های ۱، ۲ و ۰/۵ گرم بر لیتر فسفر اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت در نتیجه برای صرفه‌جویی در مقدار مصرف فسفر و صنعتی بودن آن، ۰/۵ گرم بر لیتر بهترین غلظت فسفر برای تولید پلی‌فسفات است.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس مگاتریوم*، پلی‌فسفات، بهینه‌سازی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها فسفر را جذب و آن را وارد ترکیب چندین درشت مولکول سلولی می‌کنند. تعدادی از میکروارگانیسم‌ها توانایی ذخیره فسفر را به‌عنوان پلی‌فسفات در دانه‌های خاصی به نام ولوتین دارند (۱). پلی‌فسفات‌ها، بسیاری از فسفات‌های متصل شده با پیوندهای فسفوانهیدریدی هستند و در باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها، گیاهان و جانوران یافت می‌شوند (۲). بسپارهای تولید شده توسط ارگانیسم‌های ذخیره‌کننده پلی‌فسفات شامل پلی‌فسفات، پلی‌هیدروکسی‌آلکالونات‌ها و گلیکوژن است (۳). پلی‌فسفات‌ها با فرمول $M_{n+2}P_nO_{3n+1}$ در مقایسه با ATP مولکول‌هایی با پیوند انهیدریدی پرانرژی هستند (۲) و ممکن است بیشینه ۱۰ تا ۲۰ درصد وزن خشک سلولی را در بر گیرند (۴). آنزیم‌های اصلی مرتبط با سوخت و ساز پلی‌فسفات در باکتری‌ها شامل: پلی‌فسفات کیناز ۱ (PPK1) (مسئول سنتز پلی‌فسفات)، پلی‌فسفات کیناز ۲ (PPK2)، پلی‌فسفات-آدنوزین‌مونوفسفات-فسفوترانسفراز (PAP)، اگزوپلی‌فسفاتاز (PPX) و اندوپلی‌فسفاتاز (PPN) (مسئول تجزیه پلی‌فسفات) هستند (۵ و ۶). عامل‌های محیطی زیادی مانند نوع و مقدار سوبسترا، هوازی یا بی‌هوازی بودن محیط کشت، اسیدیته، نوع و مقدار یون‌های فلزی بر تشکیل پلی‌فسفات‌ها اثر می‌گذارند (۱ و ۲). اثر نوع و مقدار سوبسترا بر روی سنتز پلی‌فسفات در سویه‌های مختلف متفاوت است (۷). امروزه کاربردهای متعددی برای این بسپار ذکر می‌شود که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- استفاده در محصولات غذایی بسته‌بندی به‌عنوان افزودنی مجاز برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها: پلی‌فسفات‌های معدنی ایمن[1] تشخیص داده شده‌اند و به شکل گسترده به‌عنوان افزودنی‌های غذایی برای افزایش ویژگی‌های عملکردی اصلی (حفظ مزه و بو، افزایش بازده به علت توانایی اتصال به آب و معلق‌سازی، تاخیر در ترشیدگی اکسایشی و کاهش رنگ و ...) در صنایع مختلف استفاده می‌شوند (۸). همچنین تاکنون مطالعات زیادی، اثر ضد میکروبی پلی‌فسفات بر روی باکتری‌های متعدد را اثبات نموده است (۹ و ۱۰).

۲- کاربرد پلی‌فسفات در انتقال دارو و ژن: پلی‌فسفات‌ها به‌عنوان یک دسته مهم از مواد زیستی برجسته، سازش‌پذیری و تجزیه‌پذیری خوبی داشته و تشابه ساختاری با اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای تایکوئیک طبیعی دارند. در سال‌های اخیر تعدادی هم-بسپار با واحدهای فسفات ساخته شده و برای انتقال دارو و ژن به‌کار رفته است. سیستم انتقال آنتی‌بیوتیک هدف‌دار، غلظت در حال چرخش دارو را کاهش می‌دهد و ارتباط اندام‌های غیر هدف را با آنتی‌بیوتیک محدود می‌کند. ارزیابی سمیت بالقوه مواد بسپاری برای کاربردهای انتقال دارو بسیار مهم و حائز اهمیت است. پلی‌فسفات‌های خطی به‌طور ممتد در سیستم انتقال دارو بررسی شده و سمی نبودن آن برای گروه‌های سلولی مختلف محرز شده است (۱۱ و ۱۲).

۳- کاربرد پلی‌فسفات در ترمیم و نوسازی استخوان: در سال‌های اخیر پلی‌فسفات کلسیم، به‌عنوان ماده‌ای امید بخش در مهندسی بافت استخوان، نه تنها به خاطر سازگاری زیستی برجسته بلکه به علت تجزیه‌پذیری قابل کنترل، قدرت فشردگی بالا و تشابه با عناصر شیمیایی استخوان، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است (۱۳).

در نتیجه، به علت اهمیت بالای این بسپار در صنعت غذا و دارو، در این تحقیق، مطالعاتی برای تعیین بهترین شرایط برای رسیدن به بیشترین میزان تولید پلی‌فسفات توسط *باسیلوس مگاتریوم* سویه G11 انجام شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم

باسیلوس مگاتریوم سویه G11 یک سویه تولید کننده پلی‌فسفات به میزان بالا و قابل‌توجه است که از خاک اطراف کارخانه تولید کننده کود شیمیایی فسفر در شهر ماهشهر استان خوزستان جداسازی و شناسایی شده است (۱۴). این باکتری در آگار مغذی کشت، در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و برای هر آزمایش دوباره فعال شد.

بهینه‌سازی نوع منبع کربن، غلظت منبع کربن و غلظت فسفر

به منظور دستیابی به میزان بیشتر پلی‌فسفات، فاکتورهای مؤثر در تولید تحت روش یک عامل در یک زمان[۲] و براساس برتری آن‌ها در تولید، بهینه شدند. در این بررسی، روش کار به این شکل بود که ابتدا منابع کربن گلوکز، لاکتوز و سوکروز برای تولید پلی‌فسفات و کاهش فسفر از محیط با یکدیگر مقایسه شدند. پس از به دست آوردن بهترین منبع کربنی، نقش غلظت آن (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گرم بر لیتر) و سپس غلظت فسفر (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ گرم بر لیتر) بررسی شد. میزان پلی‌فسفات تولید شده و فسفر حذف شده از محیط به شکل کمی هر ۶ ساعت یک‌بار تا ۵۴ ساعت تعیین شد.

محیط تولید

محیط غنی از فسفر به شکل پایه حاوی گلوکز (۱۰ گرم بر لیتر)، کلرید منیزیم (۰/۰۴۰۷ گرم بر لیتر)، سولفات آهن (۰/۰۱ گرم بر لیتر)، کلرید کلسیم (۰/۰۱۴ گرم بر لیتر)، دی‌پتاسیم فسفات (۲/۴۵۶ گرم بر لیتر)، کلرید منگنز (۰/۰۰۵۹ گرم بر لیتر)، آمونیوم مولیبدات (۰/۰۰۱ گرم بر لیتر) و کلرید روی (۰/۰۰۰۸۲ گرم بر لیتر) است. اسیدیته این محیط باید قبل از اتوکلاو با کلریدریک اسید و هیدروکسید سدیم یک نرمال در ۷/۲ تنظیم شود (۱۵). نوع و مقدار منبع کربن و مقدار نمک دی‌پتاسیم فسفات بسته به مرحله آزمایش تغییر می‌کند.

تعیین مقدار فسفر حذف شده از محیط

پنج میلی‌لیتر از کشت مایع برداشته و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱۵). محلول رویی برای محاسبه فسفر باقیمانده در محیط استفاده شد. تعیین فسفر به روش رنگ‌سنجی بر پایه واکنش با معرف بارتون (آمونیوم وانادات و آمونیوم مولیبدات) است که سبب تشکیل کمپلکس زرد رنگ فسفووانادومولیبدات و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر می‌شود (۲).

تعیین میزان پلی‌فسفات

توده سلولی حاصل از مرحله قبل، دو بار با محلول کلرید سدیم ۱/۵ مولار شامل اتیلن‌دی‌آمین‌تترا اسید استیک ۰/۰۱ مولار و فلورید سدیم یک میلی‌مولار (بافر شستشو) شستشو داده شد. سپس سوسپانسیونی از ۱/۵ میلی‌لیتر بافر شستشو و توده سلولی رسوب یافته تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه با ۲ دقیقه وقفه، روی یخ سونیکه شد. سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به‌دست آمده، ۱۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک غلیظ اضافه و برای شکست پیوندهای فسفو انهیدریدی، به مدت ۴۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. فسفر آزاد شده با کمک معرف بارتون ارزیابی شد (۱۶).

اندازه گیری وزن خشک توده سلولی

هر ۶ ساعت یک بار یعنی همزمان با نمونه‌برداری برای تعیین مقدار فسفر باقی مانده و مقدار پلی‌فسفات

تولید شده، ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ، با آب مقطر ۳ بار شستشو و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا ثابت شدن وزن، قرار داده شد (۱۷). به‌علاوه رشد سلولی با اندازه‌گیری جذب نمونه در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد.

تعیین منحنی استاندارد فسفر

۲/۴۵۶ گرم نمک دی‌پتاسیم فسفات را در یک لیتر آب مقطر حل کرده که حاوی ppm ۱۰۰۰ از P_2O_5 است. محلول استاندارد ppm ۱۰۰ با رقیق نمودن قسمتی از محلول اصلی به نسبت حجمی ۱:۱۰ تهیه شد و از این محلول استاندارد، محلول‌هایی با غلظت ppm ۱۰۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰ و صفر تهیه شد.

برای تعیین منحنی استاندارد از غلظت‌های تهیه شده یک میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش ریخته و به همه آن‌ها ۰/۱ میلی‌لیتر اسید نیتریک با غلظت ۱:۲، ۰/۶ میلی‌لیتر معرف بارتون و ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده و پس از ۱۰ دقیقه، جذب نمونه‌های مختلف در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. برای نمونه‌های مجهول، جذب نوری (OD) به‌دست آمده در فرمول مربوط به منحنی استاندارد قرار داده شد و به این ترتیب میزان فسفر آن‌ها مشخص شد (۱۸).

تحلیل آماری

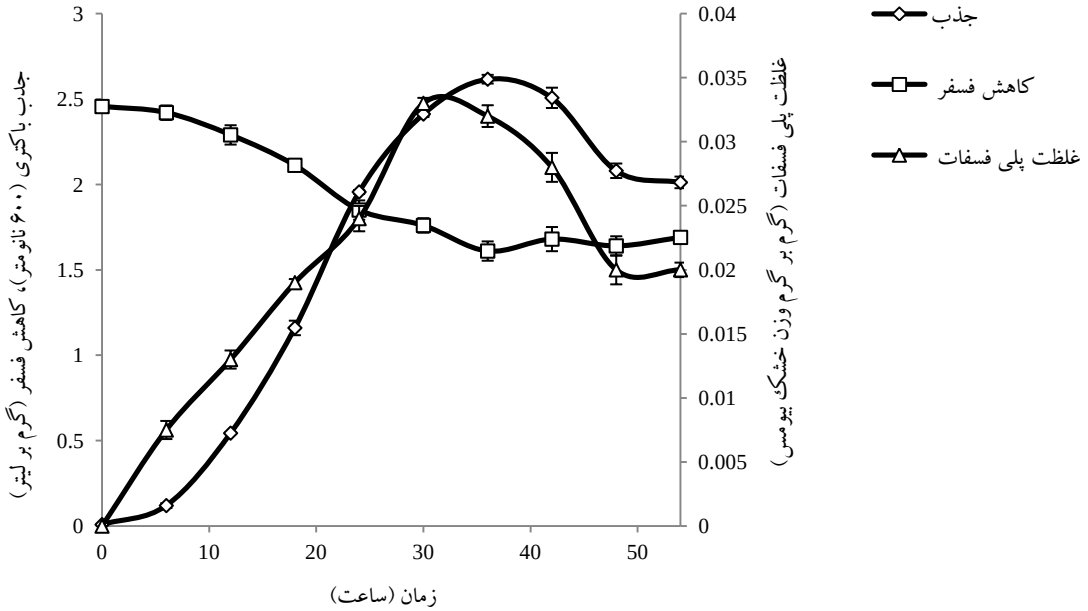
برای مقایسه تولید پلی‌فسفات و حذف فسفر از محیط در شرایط مختلف در نظر گرفته شده، از آزمون‌های تحلیل واریانس یک طرفه[۳] و توکی[۴] استفاده شد. سطح معنی‌داری در کلیه موارد ۰/۰۱ بود.

نتایج

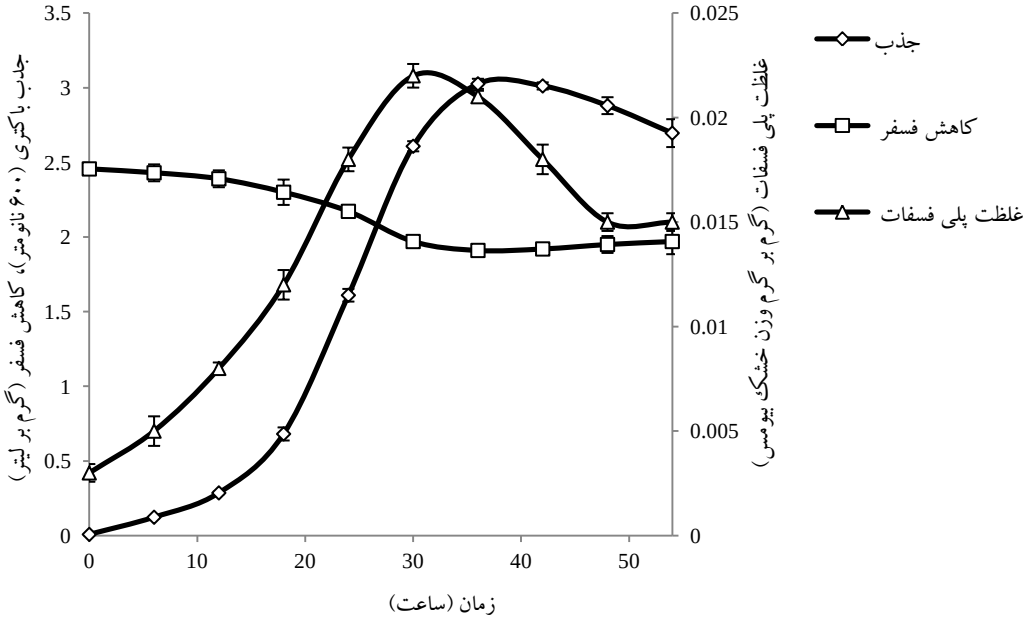
بهینه‌سازی منبع کربن

در این بررسی، سه قند گلوکز، سوکروز و لاکتوز با غلظت یک درصد برای تولید پلی‌فسفات و کاهش فسفر از محیط با یکدیگر مقایسه شدند.

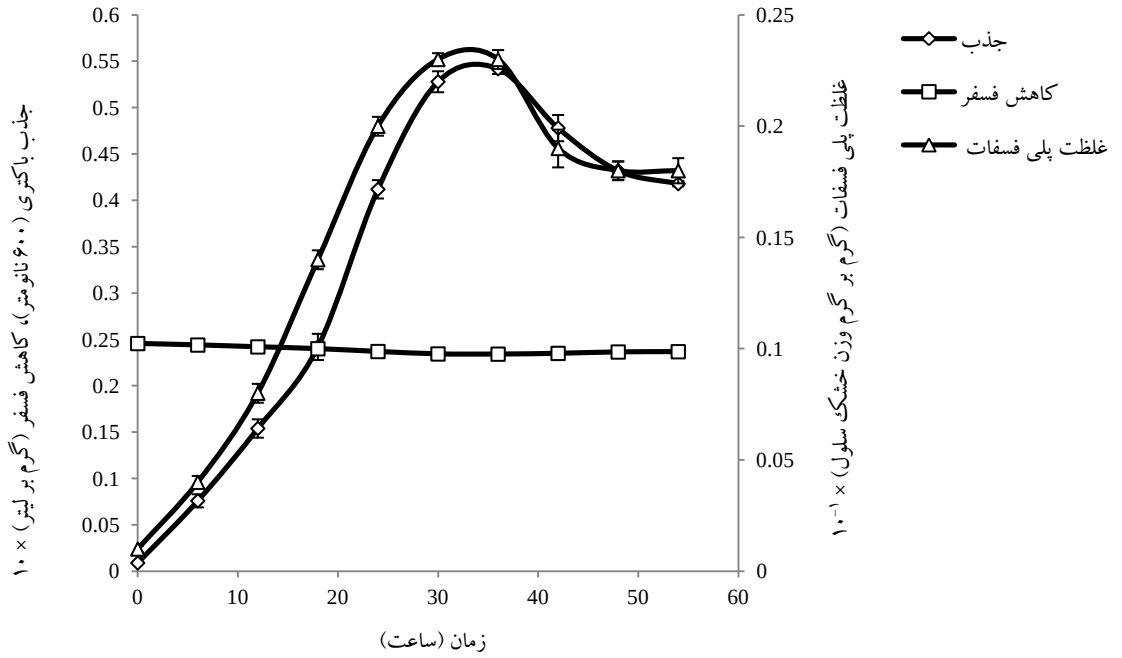
بیشترین رشد باکتری در حضور سوکروز با جذب نوری برابر با ۳/۰۲۶ و سپس به ترتیب گلوکز با جذب نوری ۲/۶۱۶ و لاکتوز با جذب نوری ۰/۵۴۲ دیده شد. از میان این سه قند، بیشترین فعالیت سلولی (گرم پلی‌فسفات بر گرم وزن خشک توده سلولی) برای تولید پلی‌فسفات و کاهش فسفر، در حضور گلوکز انجام می‌شود. برای کاهش فسفر به ترتیب سوکروز و لاکتوز و برای تولید پلی‌فسفات لاکتوز و سوکروز در مراتب بعدی هستند. در حضور گلوکز به‌عنوان منبع کربن در محیط کشت، بیشترین فعالیت سلولی از لحاظ تولید پلی‌فسفات در ساعت ۳۰، برابر با ۰/۰۳۳ گرم پلی‌فسفات بر گرم وزن خشک توده سلولی و بیشترین کاهش فسفر در محیط در ساعت ۳۶، برابر با ۱/۶۱ گرم فسفر بر لیتر است (شکل ۱). در حضور سوکروز، بیشترین فعالیت سلولی از لحاظ تولید پلی‌فسفات در ساعت ۳۰، برابر با ۰/۰۲۲ گرم پلی‌فسفات بر گرم وزن خشک توده سلولی و بیشترین کاهش فسفر در ساعت ۳۶، برابر با ۱/۹۱ گرم فسفر بر لیتر است (شکل ۲). در حضور لاکتوز، بیشترین فعالیت سلولی از لحاظ تولید پلی‌فسفات در ساعت ۳۰ تا ۳۶، برابر با ۰/۰۲۳ گرم پلی‌فسفات بر گرم وزن خشک توده سلولی و بیشترین کاهش فسفر در ساعت ۳۶، برابر با ۲/۳۴۲ گرم فسفر بر لیتر است (شکل ۳).



شکل ۱- منحنی تولید پلی‌فسفات در *باسیلوس مگاتریوم* سویه G11 و کاهش فسفر در محیط حاوی گلوکز (۱۰ گرم بر لیتر) به‌عنوان منبع کربن



شکل ۲- منحنی تولید پلی‌فسفات در *باسیلوس مگاتریوم* سویه G11 و کاهش فسفر در محیط حاوی سوکروز (۱۰ گرم بر لیتر) به‌عنوان منبع کربن

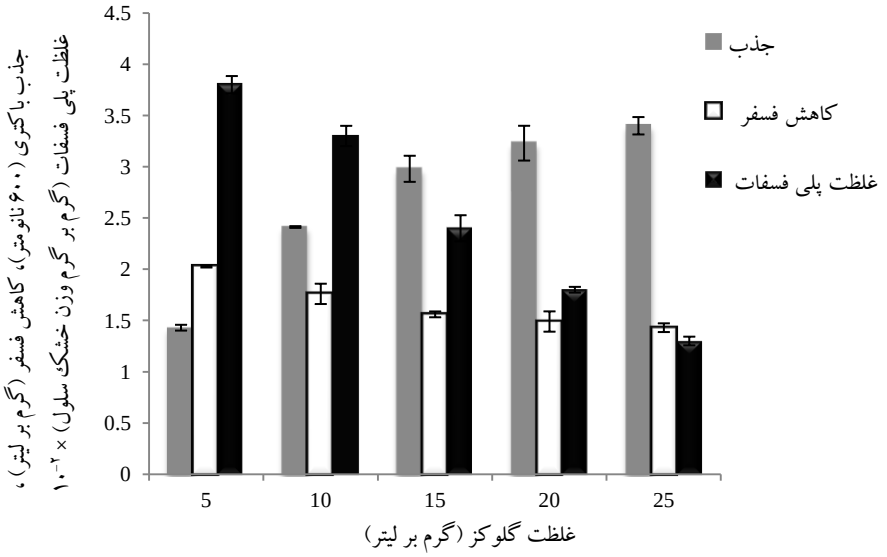


شکل ۳- منحنی تولید پلی‌فسفات در *باسیلوس مگاتریوم* سویه G11 و کاهش فسفر در محیط حاوی لاکتوز (۱۰ گرم بر لیتر) به‌عنوان منبع کربن

براساس نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، در حضور منابع کربنی متفاوت، اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۱) در تولید پلی‌فسفات و حذف فسفر از محیط به‌وسیله این سویه وجود دارد. برای مشخص شدن این‌که بین کدام گروه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد از آزمون توکی استفاده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین تولید پلی‌فسفات به گلوکز متعلق بوده، در حالی‌که لاکتوز و سوکروز رفتار مشابهی نشان دادند. همچنین بهترین منبع کربن برای حذف فسفر از محیط به‌ترتیب گلوکز، سوکروز و لاکتوز بودند. در نتیجه، گلوکز به‌عنوان بهترین منبع کربن انتخاب و غلظت آن بهینه شد.

بهینه‌سازی غلظت گلوکز

از آنجایی‌که بیشترین فعالیت سلولی از لحاظ تولید پلی‌فسفات در این محیط در ساعت ۳۰ رخ می‌دهد، پس از انتخاب گلوکز به‌عنوان بهترین منبع کربن، غلظت‌های مختلفی از آن (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گرم بر لیتر) نیز در این ساعت برای تعیین بهترین غلظت برای تولید پلی-فسفات و کاهش فسفر بررسی و آزمایش شدند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت گلوکز در محیط، سرعت رشد بالا رفته و مقدار توده سلولی افزایش پیدا می‌کند. از طرفی هر چه توده سلولی بیشتر شود، مقدار فسفر بیشتری از محیط حذف می‌شود، ولی همان‌طور که در شکل دیده می‌شود بیشترین میزان پلی‌فسفات (۰/۰۳۸ گرم پلی‌فسفات بر گرم وزن خشک توده سلولی) در کمترین غلظت گلوکز (۵ گرم بر لیتر) تولید شده و با افزایش گلوکز، مقدار آن کاهش یافته تا این‌که در بالاترین غلظت گلوکز (۲۵ گرم بر لیتر) به کمترین میزان (۰/۰۱۳ گرم پلی‌فسفات بر گرم وزن خشک توده سلولی) می‌رسد (شکل ۴).

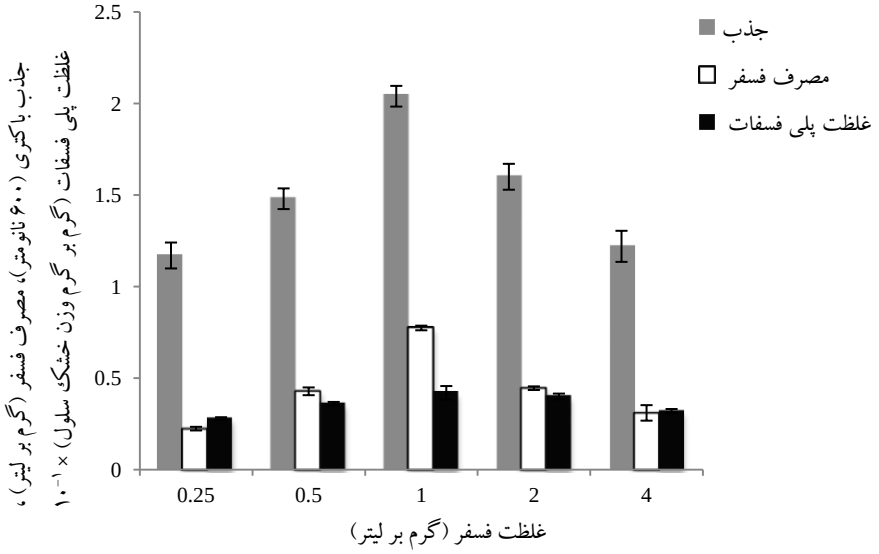


شکل ۴- مقدار تولید پلی‌فسفات در *باسیلوس مگاتریوم* سویه G11 و کاهش فسفر در محیط حاوی غلظت‌های متفاوتی از گلوکز به‌عنوان منبع کربن

براساس اطلاعات بدست آمده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، در کل اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۱) در تولید پلی‌فسفات و حذف فسفر از محیط بین غلظت‌های مختلف گلوکز وجود داشت ولی نتایج به‌دست آمده از آزمون توکی نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۲۵، ۲۰ و ۱۵، بین ۱۵ و ۱۰ و بین ۱۰ و ۵ گرم بر لیتر برای حذف فسفر وجود ندارد و بیشترین حذف مربوط به گروه اول (۲۵، ۲۰ و ۱۵) است. در نتیجه، بهترین غلظت برای حذف فسفر از محیط ۱۵ گرم بر لیتر است. از طرفی بین هر ۵ غلظت برای تولید پلی‌فسفات اختلاف معنی‌دار وجود داشت و بهترین غلظت به ۵ گرم بر لیتر متعلق بود. از آنجایی که هدف ما در این مطالعه، بیشتر تمرکز بر تولید پلی‌فسفات بود، غلظت ۵ گرم بر لیتر گلوکز برای بهینه‌سازی غلظت فسفر در محیط انتخاب شد.

بهینه‌سازی غلظت فسفر

در مرحله بعد با به کار بردن غلظت‌های متفاوتی از فسفر (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ گرم بر لیتر) بهترین غلظت فسفر، برای تولید پلی‌فسفات و کاهش فسفر، تعیین شد. بالاترین سرعت رشد و تولید توده سلولی در غلظت یک درصد فسفر شکل می‌گیرد. افزایش غلظت فسفر از ۰/۲۵ تا یک گرم بر لیتر موجب افزایش توده سلولی و افزایش بیشتر غلظت فسفر، یعنی از ۱ تا ۴ گرم بر لیتر موجب کاهش توده سلولی می‌شود. روند مصرف فسفر و تولید پلی‌فسفات نیز مطابق با جذب باکتری بود؛ به عبارت دیگر، در بیشترین توده سلولی بیشترین مصرف فسفر (۰/۷۷۴ گرم فسفر بر لیتر) و تولید پلی‌فسفات (۰/۴۲ گرم پلی‌فسفات بر گرم وزن خشک توده سلولی) و در کمترین توده سلولی کمترین مصرف فسفر (۰/۲۲۴ گرم فسفر بر لیتر) و تولید پلی‌فسفات (۰/۲۸ گرم پلی‌فسفات بر گرم وزن خشک توده سلولی) دیده شد (شکل ۵).



شکل ۵- مقدار تولید پلی‌فسفات در *باسیلوس مگاتریوم* سویه G11 و مصرف فسفر در محیط حاوی گلوکز (۵ گرم بر لیتر) و غلظت‌های متفاوتی از فسفر

براساس اطلاعات به‌دست آمده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۱) در تولید پلی‌فسفات و حذف فسفر از محیط بین غلظت‌های مختلف فسفر وجود داشت. براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون توکی بهترین غلظت برای حذف فسفر از محیط، یک گرم بر لیتر بود و بین ۲ و ۰/۵ که در مرتبه دوم و ۴ و ۰/۲۵ که در مرتبه سوم قرار داشتند، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. به علاوه برای تولید پلی‌فسفات بین غلظت‌های ۱، ۲ و ۰/۵ گرم بر لیتر در مرتبه اول، ۰/۵ و ۴ گرم بر لیتر در مرتبه دوم و ۴ و ۰/۲۵ گرم بر لیتر در مرتبه سوم اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

بحث

پلی‌فسفات‌ها مولکول‌هایی بسیار حساس بوده و در دماهای بالا و اسیدیته پایین به شکل خود به خودی تجزیه می‌شوند (۲). در این مطالعه، از کلریدریک اسید برای ایجاد محیطی با اسیدیته پایین و حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای شکست پیوندهای فسفوانهیدریدی استفاده شد.

واگابو و همکاران[5] در سال ۲۰۰۸ اثر حضور دو منبع کربن متفاوت یعنی گلوکز و اتانول را در تجمع پلی‌فسفات توسط *ساکارومیسس سرویزیه* سویه VKM Y-1173 مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که میزان پلی‌فسفات تولید شده در هر دو حالت یکسان است (۷). در این مطالعه، اثر سه منبع کربن گلوکز، سوکروز و لاکتوز بر روی تولید پلی‌فسفات در *باسیلوس مگاتریوم* سویه‌ی G11 بررسی شد. از نتایج به‌دست آمده، می‌توان به این نکته اشاره کرد که لزوما بهترین منبع کربن برای رشد و تکثیر سلول، بهترین منبع کربن برای حذف فسفر از محیط و تولید پلی‌فسفات نیست، چنان‌که رشد *باسیلوس مگاتریوم* در حضور سوکروز به نسبت بهتر از گلوکز است ولی فعالیت سلولی از لحاظ حذف فسفر و تولید پلی‌فسفات، در محیط گلوکز بیشتر است. همچنین، در محیط لاکتوز با کمترین رشد در مقایسه با سوکروز با بیشترین رشد در عین این‌که حذف فسفر از

محیط بسیار کمتر بوده ولی در هر دو حالت، باکتری رفتار مشابه از لحاظ تولید پلی‌فسفات نشان داد و این ممکن است به این علت باشد که باکتری در محیط نامناسب برای رشد، میزان زیادی از فسفر جذب شده را، صرف تولید پلی‌فسفات کرده است و از آن به‌عنوان ذخیره انرژی استفاده می‌کند.

دسن[۶] در سال ۲۰۰۲ اثر غلظت‌های متفاوت گلوکز بر جذب فسفر و تولید پلی‌فسفات در سویه‌های باکتریایی متفاوتی از *ویبریو* و *آکروموباکتر*[۷] که از دریا جدا کرده بود را بررسی و به این نتیجه رسید که جذب فسفر و تولید پلی‌فسفات به شکل هماهنگ با هم، با افزایش غلظت گلوکز، کاهش می‌یابند (۱۹). در *باسیلوس مگاتریوم* سویه G11 که در این مطالعه بررسی شد، نیز نتایجی مشابه به‌دست آمد، یعنی در پائین‌ترین غلظت گلوکز (۵ گرم برلیتر) بیشترین فعالیت سلولی از لحاظ تولید پلی‌فسفات و در بالاترین غلظت (۲۵ گرم بر لیتر)، کمترین فعالیت دیده شد. این احتمال وجود دارد که غلظت پایین منبع کربن به‌عنوان یک عامل استرسی عمل کرده و در این شرایط باکتری از پلی‌فسفات به عنوان ذخیره‌ی انرژی استفاده می‌کند.

همچنین از دیگر عوامل مطالعه شده، اثر غلظت فسفر بر تولید پلی‌فسفات بود. همان‌طور که در بخش نتایج نشان داده شد فسفر تا غلظت یک درصد محرک رشد و بیش از آن بازدارنده بود. از طرف دیگر اختلاف معنی‌داری برای تولید پلی‌فسفات بین غلظت‌های ۱، ۲ و ۰/۵ گرم بر لیتر وجود نداشت. در نتیجه برای صرفه‌جویی در مقدار مصرف فسفر و صنعتی بودن آن، ۰/۵ گرم بر لیتر بهترین غلظت فسفر برای تولید پلی‌فسفات است.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اصفهان برای حمایت از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Machnicka A. Accumulation of phosphorus by filamentous microorganisms. *Pol J Environ Stud* 2006; 15(6): 947-53.

(2) Mussig-Zufika M, Kornmuller A, Merkelbach B, Jekel M. Isolation and analysis of intact Polyphosphate chains from activated sludges associated with biological phosphate removal. *Water Res* 1994; 28(8): 1725-33.

(3) Serafim LS, Lemos PC, Levantesi C, Tandoi V, Santos H, Reis MA. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *J Microbiol Meth* 2002; 51(1): 1-18.

(4) Kulaev IS, Vagabov VM. Polyphosphate metabolism in micro-organisms. *Adv Microb Physiol* 1983; 24: 83-171.

(5) Brown MRW, Kornberg A. The long and short of it – polyphosphate, PPK and bacterial survival. *Trends Biochem Sci* 2008; 33(6): 284-90.

(6) Hooley P, Whitehead MP, Brown MRW. Eukaryote polyphosphate kinases: is the 'Kornberg'complex ubiquitous *Trends Biochem Sci* 2008; 33(12): 577-82.

(7) Vagabov VM, Trilisenko LV, Kulakovskaya TV, Kulaev IS. Effect of a carbon source on polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2008; 8(6): 877-82.

(8) Maier SK, Scherer S, Loessner MJ. Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(9): 3942–49.

(9) Borch E, Lycken L. Influence of long-chain polyphosphate and heat treatment on *Clostridium cochlearium* and *Clostridium sporogenes* isolated from processed cheese spread. *J Food Prot* 2007; 70(3): 744–7.

(10) Akhtar S, Paredes-Sabja D, Sarker MR. Inhibitory effects of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporulation and spore outgrowth. *Food Microbiol* 2008; 25(6): 802–08.

(11) Schofield SC, Berno B, Langman M, Hall G, Filiaggi MJ. Gelled calcium polyphosphate matrices delay antibiotic release. *J Dent Res* 2006; 85(7): 643-47.

(12) Liu J, Huang W, Pang Y, Zhu X, Zhou Y, Yan D. Hyperbranched polyphosphates for drug delivery application: design, synthesis, and in vitro evaluation. *Biomacromolecules* 2010; 11(6): 1564-70.

(13) Wang Q, Wang Q, Wan, C. The effect of porosity on the structure and properties of calcium polyphosphate bioceramics. *Ceram – Silik* 2011; 55(1): 43-8.

(14) Ghashghaei S. Role of phosphorus on synthesis of metachromatic granules and nanocrystal by bacteria. Isfahan: Isfahan Univ.; 2012. 82-3.

(15) Clark JE, Beegen H, Wood HG. Isolation of intact chains of polyphosphate from *Propionibacterium shermanii* grown on glucose or lactate. *J Bacteriol* 1986; 168(3): 1212-19.

(16) De Lima MAB, Do Nascimento AE, De Souza W, Fukushima K, De Campos-Takaki GM. Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *cunninghamella elegans*. *Braz J Microbiol* 2003; 34(4): 363-72.

(17) Beffa T, Blanc M, Lyon PF, Vogt G, Marchiani M, Fischer JL, Aragno M. Isolation of Thermus strains from hot composts (60 to 80 degrees C). *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(5): 1723–7.

(18) Kumar A, Kumar A, Devi S, Patil S, Payal C, Negi S. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology* 2012; 4(1): 1-5.

(19) Dasan EV. Polyphosphate accumulation by marine bacteria. Cochin: Cochin University of Science and Technology; 2002. 145-54.

1. Generally Recognized As Safe (GRAS)
2. One factor at a time
3. One way ANOVA
4. Tukey
5 . Vagabov *et al*
6. Dasan
7. *Achromobacter* sp.

Optimization of polyphosphate production by *Bacillus megaterium* strain G11

Sara Ghashghaei
M.Sc of Microbiology, University of Isfahan, Iran, ghashghaei.sara@yahoo.com
Giti Emtiazi *
Professor of Microbiology, University of Isfahan, Iran, emtiazi@yahoo.com

Abstract

Introduction: Polyphosphates, also called volutin granules, are linear polymers from orthophosphates linked by energy-rich phosphoanhydride bands that have been seen in bacteria, yeasts, fungi, plants and animals. These polymers are completely safe and nontoxic, and have numerous applications in food and drug industries.

Materials and methods: Due to the great importance and wide range of the utilization of these polymers in various industries, several factors such as various carbon sources, carbon source concentration and phosphorus concentration were studied and optimized. In order to increase polyphosphate production in *Bacillus megaterium* strain G11. The optimization process was carried out with determination of the amount of polyphosphate accumulated in cell and phosphorus removed from the medium. One-way ANOVA and Tukey tests were used in order to determine whether there was *a* significant difference between data obtained in this research.

Results: Growth of *B. megaterium* in the presence of sucrose (OD=3.026) was better than glucose (OD=2.616) whereas polyphosphate production and phosphorus removal from medium were higher in the presence of glucose (0.033 g g^{-1} dry cell weight and 1.61 g l^{-1}, respectively). On the other hand, polyphosphate production and phosphorus removal from medium coordinately were decreased with increasing glucose concentration. Furthermore, in studying the effects of phosphorus, we faced two phases of rising and falling. Actually, the increase of phosphorus concentration (0.25-1 g l^{-1}) in medium caused an increase in polyphosphate production and phosphorus removal from medium whereas both of them were decreased with a more increase in amount of phosphorus (1-4 g l^{-1}). One-way ANOVA and Tukey tests showed that there was a significant difference ($P<0.01$) between data obtained at each optimization step and the best glucose and dipotassium phosphate concentrations for polyphosphate production were 5 and 0.5 g l^{-1} respectively.

Discussion and conclusion: According to data obtained in this study, the best carbon source for cell growth and proliferation was not the best source for polyphosphate production and phosphorus removal from medium. Since there was no statically significant difference between 1, 2, and 0.5 g l^{-1} concentrations for polyphosphate production, therefore, for industrialization and economization in the level of phosphorus consumption, 0.5 g l^{-1} was the best phosphorus concentration.

Key words: *Bacillus megaterium*, Polyphosphate, Optimization

* Corresponding Author
Received: December 30, 2012/ **Accepted** February 11, 2013