

## جداسازی و شناسایی *Staphylococcus pasteurii* تولید کننده آنزیم فیتاز از ریزوسفر گندم

نشمین فیاضی حسینی<sup>۱</sup>، جمشید فولادی<sup>۲\*</sup>، خدیجه کیارستمی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۷/۰۸

تاریخ تصویب: ۹۶/۰۳/۰۳

### چکیده

فیتازها آنزیم هایی هستند که قادر به هیدرولیز اسیدفیتیک به مشتقات میو-اینوزیتول کمتر فسفریله شده می باشند. اسیدفیتیک شکل اصلی ذخیره فسفات در گیاهان است. حیوانات تک معده مانند خوک، مرغ و ماهی قادر به متابولیزه کردن اسیدفیتیک نیستند. اضافه کردن فیتاز به جیره غذایی حیوانات تک معده منجر افزایش دسترسی فسفر می گردد. در این پژوهش، هدف جداسازی و شناسایی باکتری های مولد فیتاز از ریزوسفر گندم بود. باکتری های مولد فیتاز با ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی ها در محیط حاوی فیتات سدیم شناسایی و بهترین سویه مولد فیتاز از طریق روش های مولکولی شناسایی شد. همچنین توانایی جدایه بدست آمده در حل کردن فسفات معدنی تری کلسیم فسفات در محیط *NBRIP* بررسی گردید. از میان ۱۱ سویه ایی که قادر به ایجاد هاله شفاف بر روی محیط *PSM* بودند، جدایه

این مقاله بخشی از پایان نامه نشمین فیاضی حسینی جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد با راهنمایی دکتر جمشید فولادی و دکتر خدیجه کیارستمی است.

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

\*۲- استادیار بیوتکنولوژی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

(نویسنده مسئول jfooladi@alzahra.ac.ir)

۳- دانشیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

***Staphylococcus pasteurii* دارای توانایی بالایی در تولید آنزیم فیتاز بود. طبق نتایج بدست آمده می توان عنوان کرد باکتری *Staphylococcus pasteurii* قادر به تولید آنزیم فیتاز و فسفاتاز می باشد.**

**واژه های کلیدی: ریزوسفر، فسفاتاز، فیتاز، گندم، *Staphylococcus pasteurii***

#### مقدمه

غلات، لگوم و دانه های روغنی بیش از ۹۰٪ محصولات مناطق کشت شده جهان را تشکیل می دهند. این ترکیبات سرشار از اسیدفیتیک (ميو-اینوزیتول ۱،۲،۳،۴،۵،۶، هگزا کیس فسفات) است که اولین بار در سال ۱۸۷۲ کشف شد (Vohra and Satyanarayana, 2002). اسیدفیتیک شکل اصلی فسفر در غلات، لگوم و دانه های روغنی است که ۱ تا ۲٪ وزن دانه ها و بیش از ۸۰٪ فسفر آن ها را تشکیل می دهد (Graf, et al., Empson 1987). این ترکیب به جهت حضور شش گروه فسفات که دوازده شارژ منفی را حمل می کنند، به شکل موثری می تواند از طریق تشکیل باندهای یگانه، دوگانه و سه گانه با پروتئین های دارای بار مثبت، آمینواسیدها و کاتیون ها کمپلکس نامحلول تشکیل دهد (Reddy, et al., 1989). این مسئله مهم ترین دلیل عدم جذب مواد معدنی در روده است. اهمیت نقش فیتیک اسید در این زمینه تا بدان جاست که فیتیک اسید را یکی از دلایل کمبود های تغذیه ای مواد معدنی از جمله مس، روی، آهن معرفی می کنند (Singh, et al., 2013). اتصال اسیدفیتیک به پروتئین ها و اسیدهای آمینه منجر به کاهش حلالیت و عدم دسترسی آنزیم ها نیز می شود (Lopez, et al., 2002). از طرف دیگر عملکرد آنزیم هایی مانند تریپسین، پپسین، آلفا آمیلاز و بتاگالاکتوزیداز در روده را نیز کاهش می دهد. این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی باکتری مولد آنزیم فیتاز از ریزوسفر گندم و بررسی میزان فعالیت آنزیمی آن انجام گرفت.

#### مواد و روش ها

##### نمونه برداری و جداسازی باکتری ها

به عنوان نمونه ۸ رقم مختلف گندم بومی (سیوند، چمران، زارع، تجن، پیشتان، مروارید، اروم، کویر) از موسسه بذر و نهال واقع در کرج انتخاب شدند. نمونه ها در

محل نمونه برداری در کیسه های پلی اتیلین قرار گرفته و در زمانی کمتر از ۵ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شد. بلافاصله نمونه ها به فلاسک های حاوی سرم فیزیولوژیک که از قبل تهیه و استریل شده بودند به میزان (v/v) ۱% انتقال و به مدت ۲۰ ساعت در دمای اتاق با سرعت ۱۵۰ rpm شیک زده شدند. رقت های متوالی ۱-۱۰ تا ۷-۱۰ از نمونه ها به صورت کشت چمنی به محیط کشت پایه آگاردار حاوی Yeast extract 10 g/l, pepton 10 g/l, glucose 10 g/l, NaCl 3g/l, MgCl<sub>2</sub> 0.1 g/l و آگار ۱۲ g/l انتقال و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰°C گرماگذاری شدند. جهت جلوگیری از رشد قارچ، آنتی بیوتیک سیکلوهگزامید (v/w) ۰/۱% به محیط های کشت اضافه گردید. کلنی های رشد کرده براساس خصوصیات مورفولوژیکی متمایز و هر کلنی به یک محیط جدید انتقال داده شد (Collins, et al., 1989).

### جداسازی باکتری های تولیدکننده آنزیم فیتاز

به دنبال جداسازی میکروارگانیسم های موجود در نمونه های خاک، اولین مرحله شناسایی باکتری های حل کننده ی فسفر آلی براساس ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی در نتیجه تجزیه فیتات سدیم به عنوان تنها منبع فسفات در محیط اختصاصی فیتاز (PSM) بود. ترکیبات این محیط شامل (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3g, MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O 0.5 g, KCl glucose 10g, sodium phytate 0.5 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 7.9 mg . ۱۸ آب مقطر و ۱۵ g/l آگار بود. کلنی های تک بدست آمده به صورت نقطه ایی بر روی محیط اختصاصی PSM آگاردار انتقال و بعد از گذشت ۱ تا ۳ روز در دمای ۳۰°C هاله ناشی از تجزیه ی فیتات سدیم در اطراف کلنی ها مشاهده و قابل اندازه گیری بود (Lambrechts, et al., 1992).

مرحله دوم غربالگری به منظور تایید نتایج حاصل از غربالگری کیفی اولیه و برای حذف نتایج مثبت کاذب ناشی از تولید اسید توسط برخی از باکتری ها استفاده گردید. بعد از رشد باکتری ها و ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی ها بر روی محیط (PSM) در مرحله اول، سطح پلیت ها با محلول آبی کلرید کبالت ۲ (w/v) % به مدت ۱۰ دقیقه پوشانیده شد. محلول دوم که حاوی حجم مساوی از محلول آبی مولیبدات آمونیوم ۹۲۵ (w/v) % ۶/ و محلول آبی وانادات آمونیوم (w/v) % ۰/۴۲ تازه تهیه شده بود، بعد از خالی کردن محلول اول، اضافه و در نهایت پس از ۱۰ دقیقه گرما گذاری در دمای اتاق از سطح پلیت ها برداشته شد. پس از آن، پلیت ها از نظر ماندگاری هاله مورد بررسی قرار گرفتند. در طی این مرحله هاله های کاذب ناشی از تولید اسید از بین رفته و ماندگاری هاله به

معنای تولید آنزیم فیتاز تلقی شد (Bae, Yanke et al., 1999). همچنین بر اساس قطر هاله و قطر کلنی و طبق فرمول Z-C/C هیدرولیز موثر هر کدام محاسبه گردید. سویه هایی که هیدرولیز موثر آنها بالاتر از ۵۰٪ بود، جداسازی و برای مطالعات بعدی ذخیره شدند (Sreedevi and Reddy, 2012).

علاوه بر غربالگری کیفی، غربالگری کمی براساس اندازه گیری میزان فسفر آزاد شده در محیط کشت PSM مایع نیز انجام گرفت. برای سنجش میزان فسفر، ۱ ml از محیط کشت با سرعت rpm10000 در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریژ و سوپرناتانت حاصل برای اندازه گیری میزان فسفر مورد استفاده قرار گرفت. نمونه بدون تلقیح باکتری به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد (Singh, et al., 2013). میزان فسفر آزاد شده در محیط کشت با کمک معرف بارتون اندازه گیری گردید. معرف بارتون با حل کردن ۲۵g آمونیوم مولیبدات در ۴۰۰ ml آب مقطر، و حل کردن ۱/۲۵ g آمونیوم متوانادات به ۳۰۰ ml آب جوش در یک ارلن ۱۰۰۰ ml، بعد از سرد شدن ۲۵۰ ml اسید نیتریک با وزن مخصوص ۱/۴۲ به این ترکیب اضافه، در نهایت با آب مقطر به حجم ۶۰۰ ml رسانیده شد. این محلول ضمن تکان دادن به طور آهسته به محلول آمونیوم مولیبدات اضافه می شود. این معرف باید در شیشه های تیره و در جای تاریک نگهداری گردد (Mehlich, 1953).

برای اندازه گیری میزان فسفر محلول  $400\ \mu\text{l}$  از سوپرناتانت را در لوله های آزمایش ریخته و  $600\ \mu\text{l}$  معرف بارتون و ۱ ml آب مقطر به آن اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه میزان جذب نوری در طول موج  $450\ \text{nm}$  با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری و در نهایت با کمک منحنی استاندارد تهیه شده با  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  در آب مقطر (شکل ۱) میزان فسفر آزاد شده محاسبه گردید (Mehlich, 1953).

### سنجش فعالیت آنزیم فیتاز

فعالیت آنزیم فیتاز طبق روش کووان و همکاران اندازه گیری شد (Quan, et al., 2001). برای سنجش فعالیت آنزیم  $200\ \mu\text{l}$  از محلول آنزیمی به  $800\ \mu\text{l}$  بافر استات  $0.2\ \text{M}$  با  $\text{pH } 5.5$  که حاوی  $1\ \text{mM}$  فیتات سدیم است اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری  $37^{\circ}\text{C}$  گرما گذاری شد. سپس ۱ ml تری-کلرواستیک اسید ۱۰٪ جهت متوقف کردن فعالیت آنزیم به محلول اضافه گردید. در نهایت براساس جذب نوری بدست آمده حاصل از اضافه کردن معرف بارتون مقدار فسفر آزاد شده طبق منحنی استاندارد  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  رسم شده در بافر استات  $0.2\ \text{M}$  جهت ایجاد شرایط یکسان طبق روش سنجش آنزیم محاسبه

گردید (Olstorpe et al., 2009). هر یونیت آنزیم به عنوان مقدار آنزیمی که منجر به آزاد شدن  $1 \mu\text{g}$  فسفر در دمای  $37^\circ\text{C}$  در مدت ۱ دقیقه می شود، تعریف گردید (Quan et al., 2001).

برای بررسی خارج سلولی بودن آنزیم  $1 \text{ ml}$  از محیط کشت باکتری با سرعت  $10000 \text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و از محلول صاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد (Quan et al., 2001). برای بررسی داخل سلولی بودن آنزیم فیتاز سلول های جمع آوری شده از  $100 \text{ ml}$  محیط کشت با کمک سانتریفوژ ( $10000 \text{ rpm}$ ، ۱۰ دقیقه،  $4^\circ\text{C}$ ) دوبار با  $0.9\% \text{ NaCl}$  شستشو داده شد، سپس به نسبت ۱:۱ در بافر استات  $0.1$  مولار با  $\text{pH} = 5.5$  حل شدند. نمونه که در داخل بافر به صورت تعلیقی یکنواخت بود به وسیله ۶ سیکل ۳۰ ثانیه یی با فاصله ۱۰ ثانیه با  $80-90\%$  قدرت لیز شد (Sümengen et al., 2012)، سپس  $1 \text{ ml}$  محلول حاصل از سونیکه کردن با سرعت  $10000 \text{ rpm}$  در دمای  $4^\circ\text{C}$  برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. از سوپرناتانت حاصل برای بررسی فعالیت آنزیم استفاده گردید (Sümengen et al., 2012).

#### شناسایی مولکولی سویه برتر

به منظور شناسایی سویه برتر بر اساس توالی ژن  $16\text{S rDNA}$ ، ابتدا DNA ژنومی سویه برتر به روش Set buffer استخراج گردید (Anna et al., 2012)، پس از بررسی غلظت و میزان خلوص DNA با دستگاه نانودراپ، تکثیر ژن  $16\text{S rDNA}$  با استفاده از پرایمرهای عمومی  $27 \text{ F}$   $5' \text{ AGAAGTTTGATCCTGGCTCAG}$   $3'$  و  $1492 \text{ R}$   $5' \text{ GGCTACCTTGTTACGACTT}$   $3'$ ، با حجم نهایی  $25 \mu\text{l}$  شامل  $20 \mu\text{l}$  آب مقطر،  $2.5 \mu\text{l}$  بافر  $10 \times 10^{-2}$  از هر یک از پرایمرها (غلظت  $20 \mu\text{g/ml}$ )،  $5 \mu\text{l}$  dNTP Mix (غلظت  $10 \text{ میلی مولار}$ )،  $1 \mu\text{l}$  DNA الگو و  $0.25 \mu\text{l}$  آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت  $5$  واحد) انجام گرفت (Anna et al., 2012). واکنش PCR در حجم  $25 \mu\text{l}$  به صورت  $5$  دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای  $94^\circ\text{C}$ ، سپس  $35$  چرخه حرارتی بصورت  $30$  ثانیه در دمای  $94^\circ\text{C}$ ،  $30$  ثانیه در دمای  $60^\circ\text{C}$ ،  $30$  ثانیه در دمای  $72^\circ\text{C}$  و در نهایت یک سیکل پایانی به مدت  $10$  دقیقه در دمای  $72^\circ\text{C}$  صورت گرفت. ویال های دارای محلول واکنش بدون DNA الگو به عنوان کنترل منفی در دستگاه قرار گرفت تا آلودگی های احتمالی مشخص شود. محصولات PCR به ژل آگاروز  $1\%$  در بافر TEB (X5/0) واجد اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز شد. در انتها محصول PCR تعیین توالی گردید (Anna et al., 2012).

#### آنالیز فیلوژنی و رسم درخت فیلوژنتیک

برای رسم درخت فیلوژنتیک، نتایج حاصل از تعیین توالی از هر یک از پرایمرها به

وسیله نرم افزار Bioedit با هم ادغام<sup>۱</sup>، سپس توالی بدست آمده در بانک اطلاعاتی NCBI<sup>۲</sup> (برنامه BLASTn) و EzTaxon مورد همترازی قرار گرفت و میزان شباهت ترادف نوکلئیدی با سویه های ثبت شده در بانک ژنی بررسی و توالی ها با نرم افزار MEGA5 همردیف شدند. آنالیز فیلوژنی و رسم درخت فیلوژنتیک به روش Neighbour-joining انجام شد (Tamura, et al., 2007) (شکل ۴). علاوه بر شناسایی مولکولی سویه جداسازی شده تست های بیوشیمیایی تاییدی بر اساس کتاب راهنمای سیستماتیک باکتری شناسی Bergeys انجام شدند و نتایج حاصل با نتایج مولکولی مطابقت داده شد. از جمله این تست های بیوشیمیایی آزمون کاتالاز و اکسیداز، آزمون تخمیر قندها و تولید اسید و آزمون هیدرولیز اوره بود (Holt et al., 1994).

### بررسی توانایی سویه جدا شده در حل کردن فسفر معدنی

توانایی حل کردن فسفر معدنی توسط باکتری ها بر اساس ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی در نتیجه تجزیه تری کلسیم فسفات به عنوان تنها منبع فسفات در محیط اختصاصی آگاردار NBRIP (National Botanical Research Institutes phosphate growth medium) که حاوی  $\text{glucose } 10 \text{ g}$ ,  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2 \text{ } 5 \text{ g}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O } 5 \text{ g}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.1 \text{ g}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ } 0.2 \text{ g}$ ,  $\text{KCl } 0.2 \text{ g}$  در 11 آب مقطر به همراه ۱/۵% آگار، صورت گرفت. پس از انتقال باکتری بر روی محیط اختصاصی NBRIP و گرماگذاری در دمای  $30^\circ \text{C}$  به مدت ۱ تا ۴ روز، هاله ناشی از تجزیه ی فسفات معدنی در اطراف کلنی ها مشاهده و اندازه گیری شد. pH محیط کشت قبل از اتوکلاو بر روی ۷ تنظیم شد (Kapri, 2010). غربالگری کمی براساس اندازه-گیری میزان فسفر آزاد شده از سوپرناتانت حاصل از محیط کشت باکتری انجام گرفت (Kapri, 2010).

### نتایج

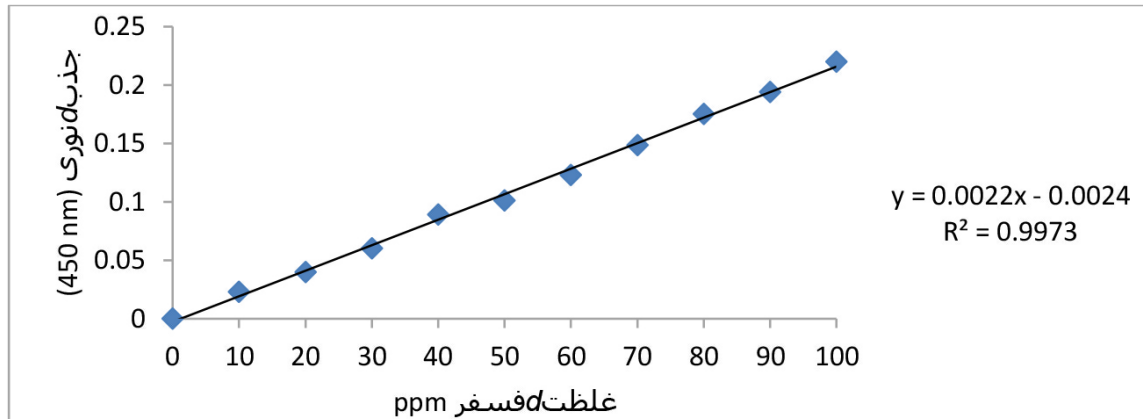
#### جداسازی و شناسایی باکتری تولید کننده فیتاز

۱۱ عدد جدایه که قادر به ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی خود در محیط اختصاصی فیتاز آگاردار بودند در غربالگری کیفی بدست آمد (شکل ۲). پس از بررسی قطر هاله ها، غربالگری کمی و فعالیت آنزیم فیتاز در نهایت یک باکتری به عنوان بهترین مولد فیتاز انتخاب گردید. قطر هاله و کلنی آن  $27 \text{ mm}$ ، هیدرولیز موثر آن ۳۵۰%، میزان فسفر آزاد محلول  $180 \mu\text{g/ml}$  و فعالیت آنزیم فیتاز آن  $0.4/1 \text{ U/ml}$  بدست آمد. این باکتری کوکوسی گرم مثبت، هوازی و بی هوازی اختیاری، فاقد حرکت، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی،

۱-Overlap

۲-National center for Biotechnology Information

فاقد آنزیم اوره آز و قادر به استفاده از قندهای ترهالوز، گلوکز، ساکارز، مانوز، ریبوز، مالتوز، مانیتول بود.



شکل ۱: منحنی استاندارد فسفر



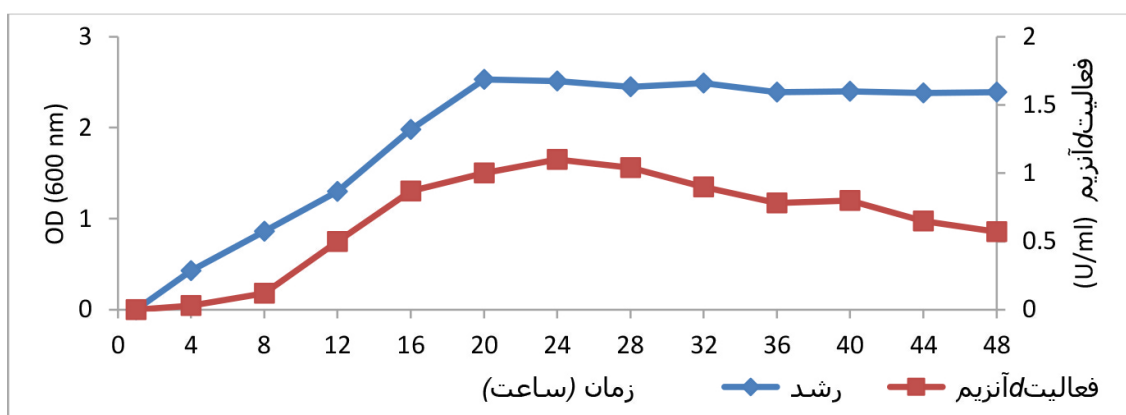
شکل ۲: مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی های تولید کننده فیتاز در محیط PSM

### سنجش فعالیت آنزیمی

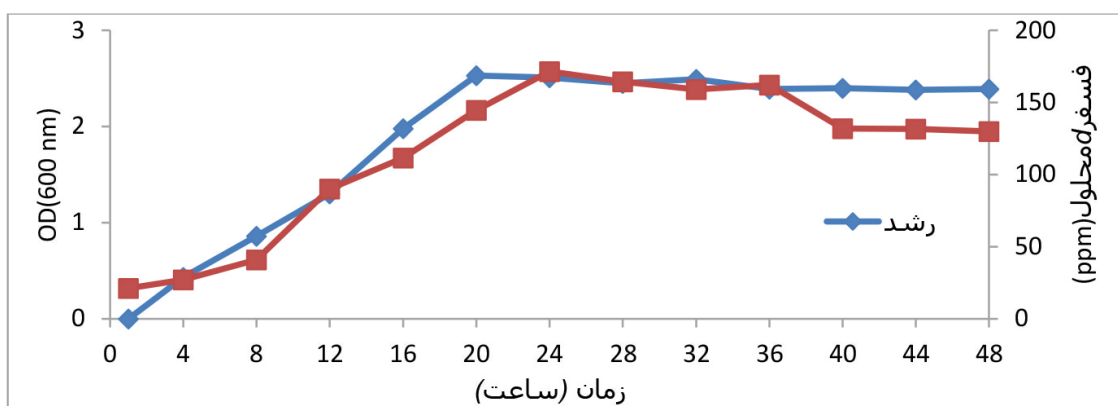
نتایج بدست آمده از سنجش فعالیت فیتاز جدایه بدست آمده نشان داد که آنزیم فیتاز این باکتری، برون سلولی است. پس از گرماگذاری ۲۴ ساعته فعالیت آنزیم در سوپرناتانت حدود ۶۴٪ در حالیکه میزان فعالیت بعد از سونیکه کردن سلول ها ۳۶٪ بود. همچنین ایجاد هاله بر روی محیط آگاردار، برون سلولی بودن آنزیم فیتاز تولیدی این باکتری را تایید کرد. در طی رشد باکتری میزان فعالیت آنزیم فیتاز افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان تولید آنزیم در اواخر فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون بدست آمد که برابر با



۱/۰۴ U/ml بود (شکل ۳). میزان فسفر محلول در طی رشد باکتری به اندازه ی  $\mu\text{g/ml}$  ۱۸۰ افزایش یافت (شکل ۴).



شکل ۳: بررسی همزمان رشد باکتری *S. pasteurii* و فعالیت آنزیم فیتاز در محیط PSM



شکل ۴: بررسی همزمان رشد باکتری *S. pasteurii* و میزان فسفر آزاد شده در محیط PSM

### بررسی توانایی باکتری در حل کردن فسفر معدنی

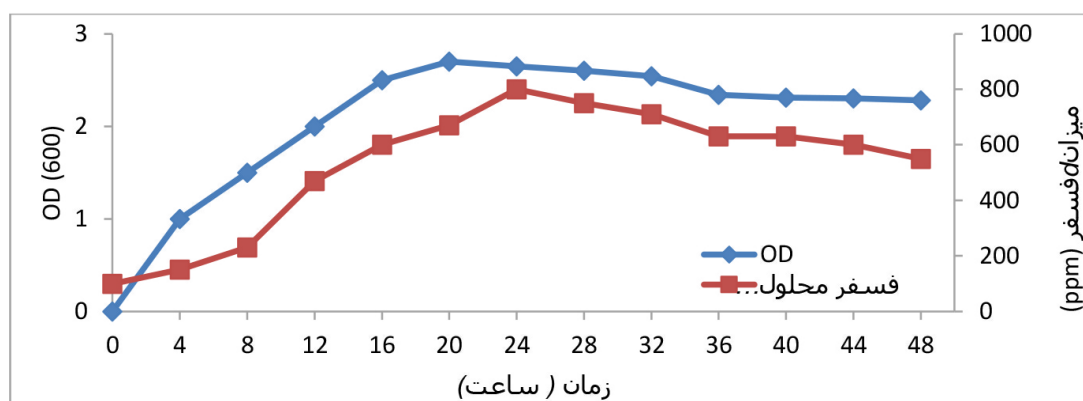
نتایج حاصل از بررسی توانایی این باکتری در قابلیت حل فسفات معدنی بر روی محیط NBRIP بصورت کیفی با ایجاد هاله شفاف (شکل ۵) و بصورت کمی با اندازه گیری میزان فسفر آزاد محلول پس از ۲۴ ساعت (شکل ۶) بیانگر توانایی این باکتری در حل



تری کلسیم فسفات بود. تری کلسیم فسفات یک ترکیب معدنی فسفات است که توسط آنزیم فسفاتاز تجزیه می شود (Kapri and Tewari, 2010). بنابراین جدایه بدست آمده با تولید آنزیم فیتاز و فسفاتاز قادر به حل فسفات آلی و معدنی می باشد. بعلاوه مقایسه قطر هاله ها و فسفر آزاد شده بیانگر توانایی بیشتر این باکتری در حل کردن فسفات معدنی نسبت به فسفات آلی بود.

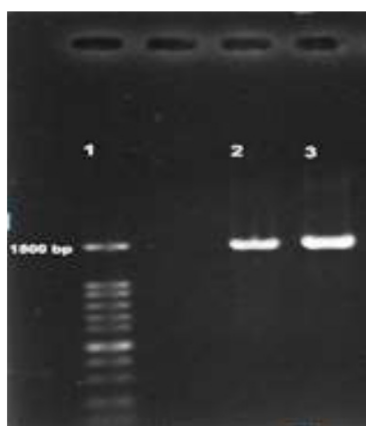


شکل ۵: مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی باکتری بر روی محیط NBRIP آگاردار با منبع فسفر تری کلسیم فسفات

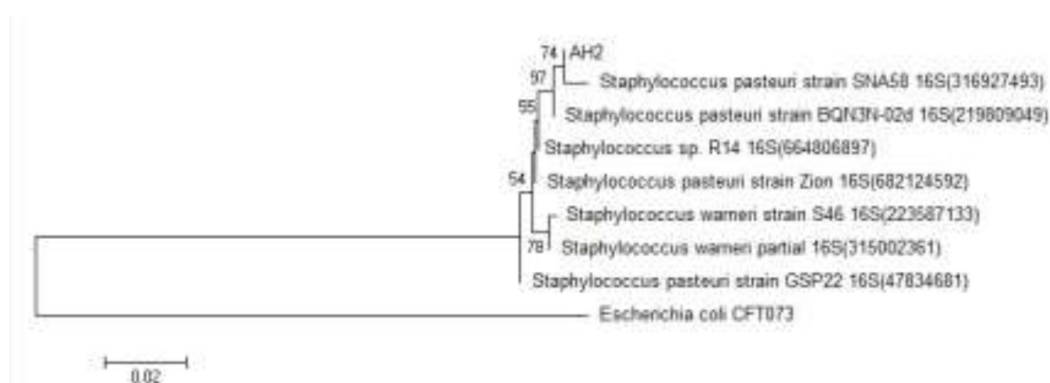


شکل ۶: بررسی همزمان رشد باکتری *S. pasteurii* همراه فسفر آزاد شده در محیط NBRIP.

نتایج PCR، تعیین توالی ژن *S. pasteurii* ۱۶S rDNA و رسم درخت فیلوژنتیک PCR ژن *S. pasteurii* ۱۶S rDNA نشان داد که اندازه ای ژن مورد نظر حدود ۱۵۰۰ bp است (شکل ۷). همچنین تطابق توالی *S. pasteurii* ۱۶S rDNA باکتری مورد نظر با سایر توالی های موجود در بانک ژنی NCBI تشابه ۹۹٪ باکتری مورد نظر را با *S. pasteurii* نشان داد.



شکل ۷: نتایج ژل الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rDNA سویه مولد فیتاز . ستون شماره ۱ نشانگر مولکولی ladder . ستون شماره ۲، ۳ محصول PCR با اندازه ۱۵۰۰ bp .



شکل ۸: درخت فیلوژنتیکی سویه مورد آزمایش (AH2) و نزدیکترین سویه های استاندارد موجود در بانک های ژنی بر اساس توالی ژن 16S rDNA . مقادیر Bootstrap که میزان اطمینان از صحت هر شاخه را نشان می دهد، بر اساس ۱۰۰۰ بار تکرار محاسبه و بصورت درصد در محل گره ها نشان داده شده است. *E. coli* به عنوان Outgroup در نظر گرفته شد. ( ۰/۰۲ Bar : مقیاسی برای طول شاخه و نشان دهنده ۲% جابجایی در جایگاه نوکلئوتیدها است).

## بحث

در پژوهش حاضر ۱۱ جدایه مولد فیتاز از ریزوسفر گندم جداسازی شد. Sasirekha از ریزوسفر مناطق کشاورزی مخصوصا مناطق کشت غلات و دانه های روغنی برای جداسازی باکتری های تولیدکننده فیتاز استفاده نمود و عنوان کرد که تعداد و تنوع باکتری های تولیدکننده فیتاز در ریزوسفر غلات بیشتر از فضولات حیوانات است (Sasirekha et al., 2012). نتایج تعیین توالی و همترازی ژن 16S rDNA شباهت (۹۹%) با

*S. pasteurii* را نشان داد. تاکنون باکتری های مختلفی به عنوان تولید کننده فیتاز معرفی شده اند، از جمله آن ها می توان *Escherichia coli*، *Bacillus sp.*، *Pseudomonas sp.*، *Enterobacter*، *Klebsiella SP* را نام برد (Hussin, et al., 2007).

باکتری *S.pasteurii* جداسازی شده قادر به تولید هاله ای به قطر ۲۷ mm بر روی محیط PSM بود. مشابه با این نتایج، حسین خانی در سال ۲۰۰۹ باکتری *Pseudomonas* مولد فیتاز که قادر به ایجاد هاله ای با قطر ۲۳ mm بر روی محیط PSM بود از فضولات پرندگان جدا کرد (Hussin, et al., 2009). Hosseinkhani, et al., 2009) گزارش داد که به استثنای *Bacillus subtilis*، *Lactobacillus* و *Bacillus*، *Staphylococcus*، *Brevibacterium*، *Kocuria* و *psedomomas* که آنزیم خارج سلولی تجریه کننده فیتات را تولید می کنند، باکتری ها فیتاز داخل سلولی تولید می کنند (Hussin et al., 2007). جدایه بدست آمده آنزیم فیتاز خارج سلولی با فعالیت ۱/۰۴ U/ml تولید می نماید. Hussin و همکاران موفق به جداسازی باکتری *Staphylococcus lentus* Strains ASUIA ۲۷۹ از کشت زار ذرت در مالزی شد که دارای فعالیت فیتازی خارج سلولی ۱/۹۱۳ U/ml بود (Hussin, Farouk et al., 2007).

Mukesh و همکاران در سال ۲۰۰۴، در غربالگری باکتری های حل کننده فسفر آلی جنس *Staphylococcus*، با متوسط قطر هاله ۳/۸ cm، به عنوان بهترین سویه مولد فیتاز معرفی کرد (Mukesh et al., 2004). با وجود آن که باکتری های جنس *Staphylococcus* به عنوان تولید کننده قوی فیتاز گزارش شده اند ولیکن تاکنون گزارشی مبنی بر توانایی باکتری *S. pasteurii* در تولید فیتاز داده نشده است. بعلاوه نتایج بدست آمده نشان داد که سویه جداسازی شده همچنین قادر به حل فسفات معدنی تری کلسیم فسفات با نسبت قطر (هاله+کلنی) به قطر کلنی ۴/۷۵ cm در محیط NBRIP بود. مشابه با نتایج بدست آمده Rashid و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه ایی، ده باکتری و سه قارچ جدا شده از ریزوسفر برنج را بررسی کردند که توانایی بالایی در حل کردن فسفات معدنی داشته و نسبت قطر (هاله+کلنی) به قطر کلنی آن ها بین ۲/۱۶ cm و ۶/۲۳ متغیر بود (Rashid et al., 2004).

Mudryk در سال ۲۰۰۴ چندین سویه باکتری را از رسوبات دریاچه جداسازی و توانایی آن ها را ابتدا در حل نمودن فسفر آلی فیتین و سپس در حل کردن فسفات معدنی تری کلسیم فسفات، منیزیم فسفات و آلومینیوم فسفات مورد بررسی قرار داد و در نهایت عنوان کرد که باکتری های حل کننده فیتین می توانند فسفر معدنی را نیز حل

کنند (Mudryk, 2004).

### نتیجه گیری کلی

تلاش های زیادی در زمینه امکان جایگزین کردن فسفر معدنی اضافه شده به غذای شکمبه داران تک معده ی با فیتاز میکروبی در جریان است. استفاده از این منبع علاوه بر کاهش آلودگی زیست محیطی مربوط به فسفر دفع شده توسط حیوانات، منجر به کاهش هزینه ها نیز می شود. تاکنون باکتری *S. pasteuri* به عنوان تولید کننده فیتاز گزارش نشده است. اما گزارشات در مورد توانایی باکتری های جنس *Staphylococcus* برای تولید فیتاز خارج سلولی وجود دارد. یک نمونه آن باکتری *S.lentus Strains* ASUIA ۲۷۹ است که به عنوان یک تولید کننده فیتاز خارج سلولی بسیار فعال معرفی شده است. جدایه بدست آمده نیز قادر به تولید فیتاز فعالی است و از آنجایی که قادر به تولید فیتاز خارج سلولی است، استفاده از آن برای تولید صنعتی فیتاز مناسب تر می باشد چراکه راحت تر می توان از آنزیم آن بهره گرفت و نیازی به شکستن سلول و جداسازی آنزیم نیست. همچنین این باکتری دارای فعالیت فسفاتازی بالایی است و می توان از آن در تجزیه زیستی فسفات معدنی نیز بهره گرفت.

### منابع

- Anna, K., Elmar, P. Timmy, S., Jorg, P., Christian, Q., Matthias, H. and Frank, O.G (2012) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and nextgeneration sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* Advance Access published 1-11
- Bae, H.D., Yank, L.J., Cheng, K.J. and Selinger, L.B (1999) A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of microbiological methods* 39(1): 17-22.
- Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M. (1989) *Microbiological methods* 6th., Butterworth, London.
- Graf, E., Empson, K.L., Eaton, J.W (1987) Phytic acid. A natural antioxidant. *Journal of Biological Chemistry* 262(24): 11647-11650.
- Holt, J., Kreig, N., Sneath, P. Staley, T., and Williams, S. (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed pp.532-553.

- Hosseinkhani, B. and G. Hosseinkhani (2009) Analysis of phytase producing bacteria (*Pseudomonas sp.*) from poultry faeces and optimization of this enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 8(17): 4229-4235
- Hussin, A. S. M., Farouk, A-E., Greiner, R., Salleh, H.M. and Ismail, A.F. (2007) Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(12): 1653-1660.
- Kapri, A. and L. Tewari (2010) Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology* 41(3): 787-795.
- Lambrechts, C., Boze, H., Mouline, G., Galzye, P. (1992) Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnology letters* 14(1): 61-66.
- Lopez, H. W, Leenhardt, F., Coudray, C. and Remesy, C. (2002) Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? *International journal of food science & technology* 37(7): 727-739.
- Mehlich, A. (1953) Determination of P, Ca, Mg, K, Na, and NH<sub>4</sub>. *North Carolina Soil Test División Publ* 1-53.
- Mudryk, Z. (2004) Decomposition of organic and solubilisation of inorganic phosphorus compounds by bacteria isolated from a marine sandy beach. *Marine Biology* 145(6): 1227-1234.
- Mukesh, P., Suma, S., Singaracharya, M.A. and Lakshmi pathi, V (2004) Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(5): 531-534.
- Olstorpe, M., Schnurer, J. and Passoth, V (2009) Screening of yeast strains for phytase activity. *FEMS Yeast Res* 9(2009)478-488.
- Quan, C., Zhang, L., Wang, Y. and Ohta, Y. (2001) Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *Journal of bioscience and bioengineering* 92(2): 154-160.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and Latif, F (2004) Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM)

- under in vitro conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences 7(2): 187-196
- Reddy, N. R., Pierson, M.D., Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K. (1989) Phytates in cereals and legumes, CRC Press, Florida.
- Sasirekha, B., Bedashree, T. and Champa, K.L. (2012) Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. European Journal of Experimental Biology 2(1): 95-104.
- Singh, N. K., Joshi, D.K. and Gupta, R.K. (2013) Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters. Jundishapur J. Microbiol 6(5): e6419.
- Sreedevi, S. and B. Reddy (2012) Isolation, Screening and Optimization of Phytase Production from newly isolated *Bacillus* sp. c43. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2(2): 218-231.
- Sümengen, M., Dincer, S. and Kaya, A. (2012) Phytase production from *Lactobacillus brevis*. Turkish Journal of Biology 36(5): 533-541
- Tamura, D.(2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24(8):1596-9.
- Vohra, A. and T. Satyanarayana (2001) Phytase production by the yeast, *Pichia anomala*. Biotechnology letters 23(7): 551-554.