نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۶، ص. ۶۰۸-۵۹۷

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 2, May.-Jun. 2017, p. 597-608

تأثیر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و کود سبز بر انحلال فسفر خاک در شرایط انکوباسیون

آزاده احسانی نژاد[1*]- علی عباسپور[2]- حمیدرضا اصغری[3]- حمیدرضا صمدلویی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۷

چکیده

حل شدن فسفر خاک توسط ریز جانداران حل‌کننده فسفات و استفاده از مواد آلی در مدیریت حاصلخیزی خاک مناسب‌تر از کودهای شیمیایی است. به‌منظور بررسی اثر آسپرژیلوس نایجر و کود سبز بر فراهمی فسفر خاک آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با ۱۰ تیمار و سه تکرار طی یک دوره ۷۰ روزه و به صورت انکوباسیون انجام شد. تیمارهای آزمایشی عبارتند از: C: شاهد ، As: آسپرژیلوس نایجر ، A: کود سبز ، S: ساکارز ، P: سنگ فسفات، As+ A ، As+S ، As+P ، As+P +S ، As+P + A. پس از ۷۰ روز pH، هدایت الکتریکی، فسفر قابل جذب و محلول در خاک اندازه گیری شدند. نتایج نشان داد در طول زمان با به کارگیری تیمارها pH خاک کاهش و هدایت الکتریکی، فسفر محلول و فسفر قابل دسترس خاک افزایش یافته است. بیشترین فسفر محلول و قابل دسترس در تیمار As+P + A مشاهده شد بطوری که فسفر محلول را ۵۸ درصد و فسفر قابل دسترس خاک را ۴۳ درصد افزایش داد. نتایج حاصله مؤید آن است که استفاده از ریز جانداران حل کننده فسفات و مواد آلی می تواند موجب افزایش انحلال فسفر خاک گردد.

واژه‌های کلیدی: قارچ حل کننده فسفات، اسیدآلی، سنگ فسفات، فسفر، قارچ حل کننده فسفات، ماده آلی

مقدمه

فسفر یکی از عناصر غذایی پر نیاز موجودات زنده است که از نظر اهمیت غذایی در گیاهان پس از نیتروژن در درجه دوم این فسفر جزیی از پروتئین یاخته بوده و به عنوان بخشی از پروتئین هسته، غشاء یاخته ای و اسیدهای نوکلئیک نقشی گیاهان افزایش می دهد. هنگامی که این عنصر به مقدار کافی عرضه شود کیفیت بعضی از میوه ها، علوفه مرتعی، سبزی ها و غلات بهتر می شود و مقاومت گیاه در برابر بیماری ها نیز افزایش می یابد (۸،۲۶،۱۷).

فسفر در بیشتر خاکها با کلسیم و به ندرت با آهن و آلومینیوم تشکیل کمپلکس می‌دهد .به دلیل ظرفیت بالای برخی خاکها برای تثبیت فسفر، تحرک آن در خاک در مقایسه با سایر عناصر بسیار کم است. در خاکهای آهکی رسوب فسفر به صورت فسفات کلسیم، عامل اصلی کاهش قابلیت جذب فسفر در خاک به شمار می‌رود (۱۸). جلالی و کلاهچی (۱۲) نشان دادند زمانی که کود فسفر به خاک افزوده می‌شود، بخشی از آن باعث افزایش فسفر محلول و مابقی رسوب می‌نماید و با قدرت زیاد در خاک تثبیت می‌شود که به آسانی با فسفر محلول به تعادل نمی‌رسد. جاوید و روویل (۱۳) در مطالعه اثر خوابانیدن بر قابلیت عصاره‌گیری فسفر گزارش کردند که بعد از گذشت ۴۵ تا ۹۰ روز تا ۸۰ درصد از فسفر مصرفی به صورت غیر قابل جذب درآمده و قابل عصاره‌گیری به روش اولسن نیست.

معایب کودهای شیمیایی و هزینه بالای تولید آنها همچنین صدمات زیست محیطی ناشی از مصرف آنها باعث شده که تولید کودهای زیستی و استفاده از منابع جایگزین در مقایسه با مصرف کودهای شیمیایی از منافع اقتصادی و زیست محیطی فراوانی برخوردار باشد. کودهای بیولوژیک علاوه بر صرفه اقتصادی باعث پایداری منابع خاک، حفظ توان تولید در دراز مدت و جلوگیری از آلودگی آبهای سطحی و زیرزمینی می‌گردند (۱۱).

دخالت ریزجانداران در افزایش حل پذیری فسفاتهای معدنی، در دهه اول قرن بیستم شناخته شد و از آن زمان تاکنون مطالعات زیادی در این باره انجام شده است. این ریز جانداران از مکانیزم‌های متفاوتی برای افزایش انحلال ترکیبات فسفر خاک استفاده می‌کنند که برای

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
(*- نویسنده مسئول: Email: Azadeh.ehsani.az@gmail.com)
۲- دکتری خاکشناسی، دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
۳- دکترای زراعت، دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
۴- دکتری بیوتکنولوژی مواد غذایی، استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

DOI: 10.22067/jsw.v31i2.55407

نمونه می‌توان به اسیدی شدن و کلاته شدن اشاره کرد. باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیست ها از جمله این ریزجانداران هستند که باعث افزایش حلالیت فسفر می شوند. گونه هایی از ریزجانداران که قادر به رهاسازی فسفر از منابع نامحلول هستند شامل *باسیلوس، سودوموناس، پنیسیلیوم و آسپرژیلوس نایجر* می‌باشند. ریزجانداران حل کننده فسفات با تولید اسیدهای معدنی (اسیدهای کربنیک و سولفوریک)، اسیدهای آلی (سیتریک، بوتیریک، اگزالیک، مالونیک، لاکتیک و غیره) و تو لید آنزیم فسفاتاز باعث انحلال فسفات معدنی و آلی می شوند (۳۰). قارچ *آسپرژیلوس نایجر* نیز با تولید متابولیتها و اسیدهای آلی باعث کاهش pH و در نتیجه فراهمی فسفر در خاک می شود (۲۸).

اثر اضافه نمودن مواد آلی به خاک نیز باعث بهبود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک می شود. استفاده از مواد آلی نیز باعث افزایش واکنش پذیری خاک فسفات و فراهمی بیشتر فسفر می شود. در حین تجزیه مواد آلی، فعالیت میکروبی افزایش می یابد و در نتیجه مقدار زیادی اسیدهای آلی و مواد هومیکی تولید می شود و باعث اسیدی شدن خاک فسفات و فراهمی فسفر می شود (۲۸). چن و همکاران (۶) تأثیر کاربرد کمپوست را در دو نوع خاک رسی لومی و سیلتی لومی مورد بررسی قرار دادند، کمپوستهای بکار رفته کمپوست کود گاوی، کود خوکی و کمپوست کاه بود. نتایج نشان داد در هرسه نوع کمپوست میزان تثبیت فسفر در خاک کاهش یافت. در این آزمایش کمپوست کاه بیشترین قابلیت را در کاهش تثبیت فسفر در خاک داشت. آنها گزارش کردند که احتمالا آهن، آلومینیوم و کلسیم با اسیدهای هومیک و اسیدهای آلی که در اثر تجزیه مواد آلی آزاد شدند ترکیب شده و بنابراین جذب و تثبیت فسفر در خاک کاهش می یابد، احتمال دیگر این است که سایتهای جذب فسفر بوسیله ترکیبات آلی فسفر بویژه اسید فیتیک اشغال شود. تغییر بار سطحی کلوئیدهای خاک در کاهش جذب فسفر در خاک و افزایش فراهمی آن در خاک می باشد .بنابراین مواد آلی با بهبود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و ممانعت از تثبیت فسفر در خاک قابلیت جذب فسفر در گیاه را افزایش می‌دهد. هدف از این آزمایش بررسی تأثیر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و مواد آلی بر افزایش انحلال فسفر خاک بود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری خاک در اردیبهشت ماه ۱۳۹۳ از شهرستان شاهرود از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی متری خاک انجام شد. نمونه‌های خاک پس از خشک شدن در مجاورت هوا، با چکش چوبی کوبیده و از الک ۲ میلی متری عبور داده شدند. مقداری از خاک جهت انجام تجزیه های فیزیکی و شیمیایی (جدول۱) و بقیه جهت آزمایشات انکوباسیون مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری اسیدیته خاک با pH متر بر روی عصاره ۱:۲/۵و هدایت الکتریکی با استفاده از دستگاه هدایت سنج بر روی عصاره ۱:۲/۵ اندازه گیری شد.

قارچ *آسپرژیلوس نایجر* از کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه صنعتی شاهرود تهیه و در محیط کشت عصاره مالت آگار کشت داده شده شد و ۷ روز بعد از کشت، قارچ را از محیط کشت جدا کرده بدین صورت که هر پتری دیش حاوی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط و به تیمارهای مورد نظر افزوده شد.

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با ۱۰ تیمار و هر تیمار در ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

Table 1- Selected physical and chemical properties of Soil used

بافت خاک soil Texture	pH	EC (dS/m)	فسفر محلول Ps (mg/l)	فسفر قابل دسترس Pa (mg/kg)	ماده آلی (درصد)	T.N.V (درصد)
لوم	8.17	0.21	0/34	24/11	0/90	26/8

: درصد آهک Total Neutralizing Value : فسفر محلول Soluble phosphorus : فسفر قابل دسترس Available phosphorus

جدول۲- برخی از خصوصیات سنگ فسفات مورد استفاده

Table 2- Selected properties of Rock phosphate used

pH	EC (dS/m)	Pa (٪)	Ps (٪)
5/75	0/91	37/5	0/16

جدول۳- تیمارهای مورد استفاده

Table 3- Treatments used

Cشاهد control	As+ A *Aspergillus niger* + Green manure
As*آسپرژیلوس نایجر* *Aspergillus Niger*	As+S *Aspergillus Niger* + Sucrose
Aکود سبز Green manure	As+P *Aspergillus niger* + Rock phosphate
Sساکارز Sucrose	As+P +S Aspergillus niger + Rock phosphate + Sucrose
Pسنگ فسفات Rock phosphate	As+P + A Aspergillus niger + Rock phosphate + Green manure

در این آزمایش، نمونه‌های ۵۰ گرمی از خاک در ۳ تکرار توزین و به داخل ظروف پلاستیکی منتقل و سپس تیمارهای مربوطه بـه آنهـا اضافه و به طور کامل با خاک مخلوط شد. رطوبت خاک داخل ظروف با آب مقطر سترون به حد ۶۰ درصد ظرفیت زراعی رسانده شد و بعـد از توزین و یادداشت وزن آنها، درب ظروف را بسته و به منظور تبـادل هوای داخل ظروف با اتمسفر، چند سـوراخ خیلـی ریـز بـر روی درب ظروف نمونه‌ها ایجاد گردید. ظروف حاوی نمونه‌ها در دمای اتاق و به مدت ۱۰ هفته نگهداری شدند. با توزین مداوم ظروف، مقـدار کـاهش رطوبت خاکها با افزودن آب مقطر جبـران گردیـد. در فواصـل زمـانی ۲۱،۷، ۳۵، ۵۱، ۷۰ روز نمونه‌ها برداشته و جهت انجام تجزیه‌هـا هـوا خشک، کوبیده و آماده شد و بعد از گذراندن از الک ۲ میلی‌متری pH، EC و فسفر محلول خاک در عصـاره ۱بـه ۲/۵ و مقـدار فسـفر قابـل دسترس به روش السن توسط دسـتگاه اسـپکتروفتومتر انـدازه گیـری شد(۱۹). کلیه داده‌های به دست آمده از آزمایشات بـا اسـتفاده از نـرم افزارMSTAT-C انجام شد. برای رسم نمودار ها و شـکل‌هـا از نـرم افزار Excel استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) و در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

اثر تیمارها و زمان نگهداری بر pH خاک

نتایج تجزیه واریانس داده‌هـا (جـدول ۳) اثـرات تیمـار و زمـان و همچنین اثر متقابل تیمار در زمـان را بـرای pH در سـطح احتمـال ۱ درصد معنی دار نشان می دهد. شـکلهای (۱) و (۲) اثـر تیمارهـا بـر pH خاک و تغییرات آن در طول زمان نگهداری را نشـان مـی دهـد. لازم بذکر است به علت زیـاد بـودن تیمارهـا و گویـا نبـودن شـکلها، تیمارها در دو شکل رسم گردیده است. در طول زمان با بـه کـارگیری تیمارها pH خاک کاهش یافته است، میـزان کـاهش و تغییـرات pH نسبت به زمان متغیر بوده به طوری که با گذشت زمان pH بسـته بـه نوع تیمارها به میزان بیشتری نسبت به دوره زمانی قبلی کاهش یافته است که نشان دهنده ایجاد شرایط مناسبتر در طول زمان بـرای تـأثیر تیمارها بوده است. pH سوسپانسیون ۱به ۲/۵ خاک بـه آب در نمونـه شاهد برابر ۸/۱۷ می باشد (جدول ۱) که نشان دهنـده قلیـایی بـودن خاک است. در تیمار شاهد مقدار کاهشpH در طول زمـان نگهـداری (۷۰ روز) بسیار جزئی است که ممکن است به خاطر تجزیه مـواد آلـی بومی خاک باشد. با توجه به شکل (۱) بیشترین تغییـرات pH مربـوط به تیمار (As + A) و در دوره زمانی ۳۵ تا ۷۰ روز می باشد. این تیمار در انتهای زمان انکوباسیون در مقایسه با تیمار شـاهد(C) ۰/۵۹ واحـد کاهش داشته است. این در حـالی اسـت کـه تیمارهـای *آسـپرژیلوس نایجر* (As) و کود سبز (A) به تنهایی تأثیر کمتـری روی pH داشـته اند.

معمـولاً بـا تجزیـه کـود سـبز و آزاد شـدن دی اکسـید کـربن و اسیدهای آلـی، pH خاکهـای قلیـایی بتـدریج کـاهش مـی یابـد. در آزمـایش انکوباسـیونی کـه در یـک دوره ۱۰ روزه انجـام شـد قـارچ *آسپرژیلوس نایجر* باعث کاهش pH در طول این دوره شد بطوری که قارچ *آسپرژیلوس نایجر* توانست pH را از ۵ به ۳ برسـاند (۴). زروآل و همکاران(۳۴) بیان کردند استفاده از قـارچ *آسـپرژیلوس نـایجر* باعـث کاهش قابل توجهی در pH می شود و این کـاهش در روزهـای آخـر انکوباسیون بدلیل رشد بیشتر زیست توده قارچ افزایش می یابد. پـس از تیمار شاهد به ترتیب ساکارز و کود سبز کمترین کـاهش pH را در طول ۷۰ روز داشته است. علت تأثیر کم مواد آلـی بـدلیل کنـد بـودن سرعت تجزیه آن بوده است. مواد آلی حاوی اسیدهای ضعیف آلی می باشد که افزودن مستقیم این مواد به خاک نیز باعـث ایجـاد تغییـرات خیلی کم در واکنش خاک می شود (۲). تیمـار *آسـپرژیلوس نـایجر* + ساکارز (As+S) توانست pH خاک را در پایان دوره نسبت بـه شـاهد (C) ۰/۴۶ واحد کـاهش دهـد و ایـن در حـالی اسـت کـه تیمارهـای *آسپرژیلوس نایجر* (As) و ساکارز (S) به تنهـایی pH خـاک را کمتـر کاهش دادند. تحقیقات نشـان داده اسـت کـه در حضـور یـک منبـع مناسب کربن، بعضی از باکتریها و قارچها قادر به تولید اسیدهای آلـی با وزن مولکولی کم می باشند که باعث کاهش pH محیط می شـوند

(۲۴). حضور ساکارز همراه با قارچ *آسپرژیلوس نایجر* منجر به رشد بیشتر قارچ، تولید اسید سیتریک بیشتر و در نتیجه کاهش بیشتر pH خاک می شود. کارم و همکاران (۱۶) بیان کردند هرچه منبع کربن بیش تری در اختیار قارچ آسپرژیلوس نایجر باشد تولید اسید سیتریک بیش تری می کند. آنها دریافتند که از بین منابع کربن, ساکارز تاثیر بیش تری نسبت به گلوکز دارد.

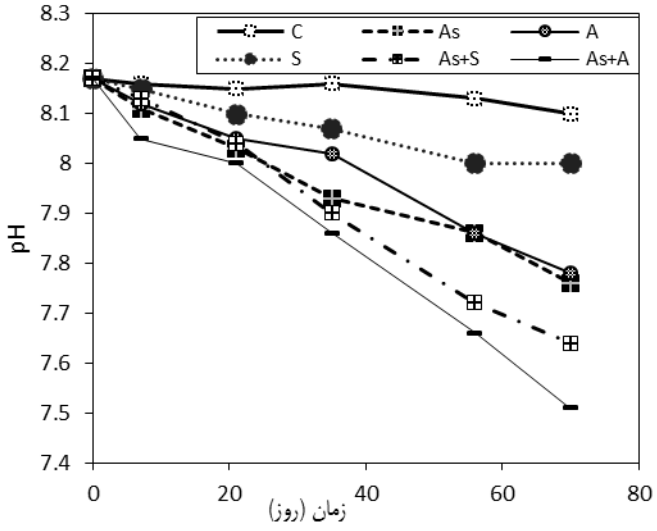
شکل (۲) نشان می دهد که کاربرد تیمارها باعث کاهشpH خاک نسبت به تیمار سنگ فسفات (P) شده است. بیشترین تغییرات pH با مقدار ۰/۱۱ واحد نسبت به تیمار سنگ فسفات مربوط به تیمار *آسپرژیلوس نایجر* + سنگ فسفات + کود سبز (As+A+P) است که این کاهش می تواند مربوط به آزاد شدن اسیدهای آلی حاصل از تجزیه مواد آلی و اسیدهای آلی تولید شده توسط قارچ حل کننده فسفات باشد. لازم بذکر است که افزودن سنگ فسفات با pHبرابر ۵/۷۵ نیز سبب کاهش pH خاک می‌گردد. بعد از تیمار فوق تیمار *آسپرژیلوس نایجر* + ساکارز (As+S)کمترین pH را نسبت به تیمار سنگ فسفات (P) داشته اند. ولی بطور کلی تیمارها تأثیر کمتری در کاهش pH در مقایسه با تیمارهای بدون سنگ فسفات داشته اند. ناریانسامی و بیسوا (۲۱) عنوان کردند که در جریان فرآیند کمپوست شدن و تجزیه مواد آلی مقداری دی اکسید کربن متصاعد می‌شود و در محیط تولید اسید کربنیک می‌کند و این اسید ضعیف موجب کاهش pH، انحلال خاک فسفات و افزایش فراهمی فسفر در خاک فسفات می شود و در نتیجه کارآیی خاک فسفات افزایش می‌یابد. شیو و همکاران (۲۷) دریافتند که *آسپرژیلوس نایجر* به تنهایی قادر به کاهش pH خاک می باشدکه بهترین درجه حرارت برای فعالیت قارچ ۲۰ درجه سانتی گراد می باشد. تحقیقات ژیائو و همکاران (۳۳) نیز نشان داد که استفاده از *آسپرژیلوس نایجر* و سنگ فسفات سبب کاهش معنی دار pH, افزایش فسفر محلول شد. آنها کاهش pH را عمدتاً به افزایش تولید اسید گلوکونیک توسط قارچ نسبت دادند.

جدول٤- نتایج تجزیه واریانس مربوط به برخی خصوصیات شیمیایی خاک

Table 4-Analysis of variance on some soil chemical properties

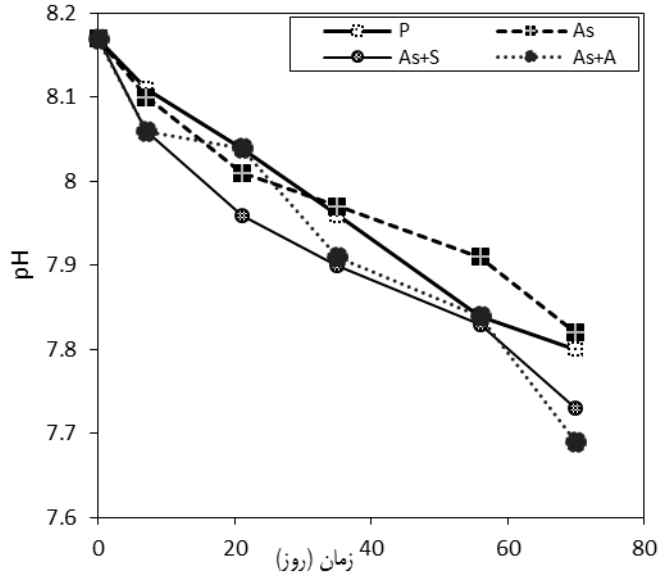
		میانگین مربعات MeanSquare			
منابع تغییرات Source	درجه آزادی degree of freedom	pH	EC	فسفر محلول Ps	فسفرقابل دسترس Pa
Treatmentتیمار	9	٭٭0/13	٭٭0/23	٭٭0/115	٭٭39/37
Timeزمان	4	٭٭0/53	٭٭1/49	٭٭0/316	٭٭92/14
Treatment* Time زمان × تیمار	36	٭٭0/013	٭٭0/021	٭٭0/006	٭٭4/48
Errorخطا	98	0/011	0/005	0/001	0/09

** indicating a significant at the probable level of 1%



شکل۱- اثر تیمارها و زمان نگهداری برpH خاک بدون کاربرد سنگ فسفات

Figure 1- Effect of the treatments and incubation time on soil pH with out the use of rock phosphate



شکل۲- اثر تیمارها و زمان نگهداری برpH خاک همراه با کاربرد سنگ فسفات

Figure 2- Effect of the treatments and incubation time on soil pH with the use of rock phosphate

اثر تیمارها و زمان نگهداری بر هدایت الکتریکی خاک

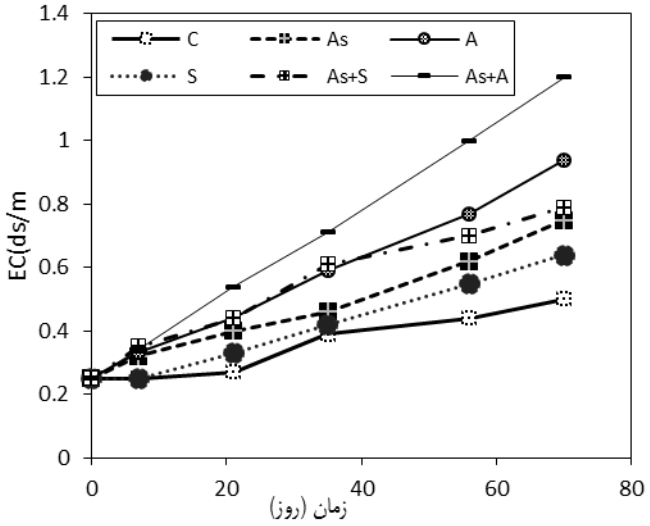
نتایج تجزیه واریانس داده ها (جدول۳) اثرات تیمار و زمان و همچنین اثر متقابل تیمار در زمان را برای هدایت الکتریکی در سطح احتمال ۱درصد معنی دار نشان می دهد. شکلهای (۳) و (۴) اثر تیمارها بر هدایت الکتریکی خاک و تغییرات آن در طول زمان نگهداری نمونهها را نشان می دهد. شکل (۳) نشان می دهد در طول زمان نگهداری، هدایت الکتریکی افزایش یافته که بسته به تیمارها این افزایش متفاوت است. با توجه به شکل تیمار *آسپرژیلوس نایجر* + کود سبز (As+A) هدایت الکتریکی خاک را در دوره ۷۰ روزه در مقایسه با تیمار شاهد (C) ۰/۷۰ دسی زیمنس بر متر افزایش داده است. با اعمال تیمار قارچ *آسپرژیلوس نایجر*(As) به کود سبز(A) مشاهده می شود که هدایت الکتریکی به مقدار بیشتری نسبت به تیمار کود سبز افزایش داشته است که دلیل آن دخالت قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در تجزیه کود سبز و آزاد سازی عناصر موجود در آن می باشد. لازم بذکر است که این افزایش طی روزهای ۵۶ تا ۷۰ بیش تر بوده است.

لازمه افزایش هدایت الکتریکی توسط کودسبز تجزیه آن و آزادسازی عناصر موجود در آن است که این پروسه زمان بر است. افزایش هدایت الکتریکی خاکها به دلیل ترکیبات معدنی موجود در کود سبز است. ضمن اینکه با تجزیه کود سبز، عناصر معدنی موجود در بخش آلی بصورت یون آزاد می شود که سبب افزایش غلظت یون‌های محلول و در نتیجه افزایش هدایت الکتریکی خاک می گردد. نتایج مشابهی نیز بوسیله تحقیقات کارتیکیان و همکاران (۱۵) گزارش شده است. آنها دلیل افزایش هدایت الکتریکی در اثر کاربرد کودگاوی را عمدتاً به دلیل افزایش غلظت یون نیترات (اکسایش یون آمونیوم) معرفی کردند. با توجه به شکل (۴) استفاده از سنگ فسفات تأثیر بیش تری در افزایش هدایت الکتریکی خاک نسبت به تیمارهای فاقد سنگ فسفات داشته است, بطوریکه بیشترین میزان هدایت الکتریکی در تیمار *آسپرژیلوس نایجر* + کود سبز + سنگ فسفات (As+A+P) مشاهده شدکه توانست هدایت الکتریکی خاک را طی این دوره ۷۰ روزه ۰/۹۶ دسی زیمنس بر متر افزایش دهد. طبیعی است که این افزایش بدلیل هدایت الکتریکی بالای سنگ فسفات می باشد(جدول ۲).

اثر تیمارها و زمان نگهداری بر فسفر محلول خاک

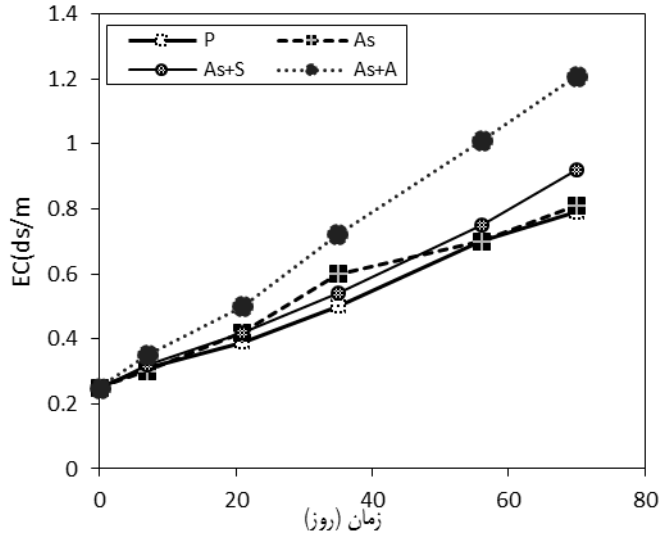
نتایج تجزیه واریانس دادهها (جدول ۳) نشان داد که اثرات تیمار و زمان و همچنین اثر متقابل تیمار و زمان بر فسفر محلول خاک در سطح ۱ درصد معنی دار است. شکل‌های (۵) و (۶) اثر تیمارها بر فسفر محلول خاک و تغییرات آن در طول زمان نگهداری نمونه‌ها را نشان می دهد. با توجه به شکل (۵) تمام تیمارها نسبت به شاهد روند افزایشی داشته و بیش ترین میزان فسفر محلول مربوط به تیمار *آسپرژیلوس نایجر* + کود سبز (As+A) و به مقدار ۷/۵۶ میلی گرم بر لیتر بود. این در حالی است که تیمار کود سبز و *آسپرژیلوس نایجر* به تنهایی فسفر محلول خاک را افزایش داده ولی با اعمال تیمار قارچ *آسپرژیلوس نایجر*(As) به کود سبز(A) مشاهده می شود که فسفر محلول خاک به مقدار بیشتری افزایش یافته است . قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با تولید اسیدهای آلی باعث کاهش pH و افزایش فراهمی فسفر در خاک می‌شود. مواد آلی نیز نقش مهمی در قابل دسترس

شدن فسفر دارند، تأثیر مثبت مواد آلی می تواند به دلیل فراهم شدن شرایط بهتر برای ریز جانداران حل کننده فسفات باشد . کمترین مقدار فسفر محلول نیز بعد از شاهد (C) مربوط به تیمار ساکارز (S) و به مقدار ۴/۹ میلی گرم بر لیتر بود.



شکل۳- اثر تیمارها و زمان نگهداری بر هدایت الکتریکی خاک بدون کاربرد سنگ فسفات

Figure 3- Effect of the treatments and incubation time on soil electrical conductivity with out the use of rock phosphate



شکل٤- اثر تیمارها و زمان نگهداری بر هدایت الکتریکی خاک همراه با کاربرد سنگ فسفات

Figure 4- Effect of the treatments and incubation time on soil electrical conductivity with the use of rock phosphate

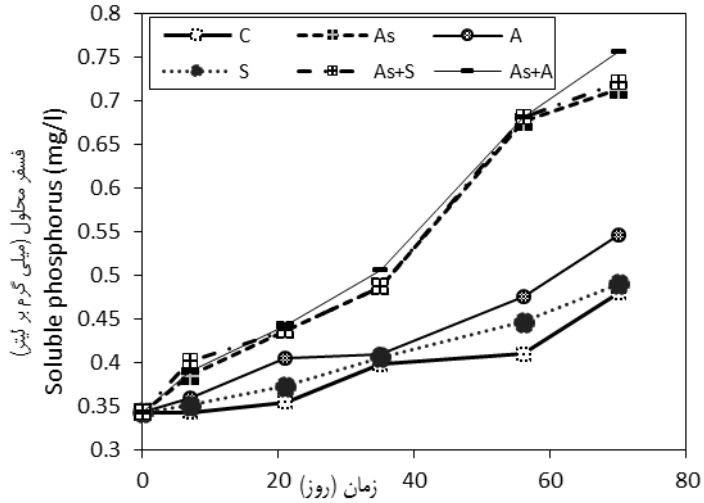
کاسی (۱۹) توانایی یزجانداران در افزایش فسفر محلول در اب در محیط های حاوی سنگ فسفات و محیط جامد حاوی تری کلسیم فسفات را با یکدیگر مقایسه کردند. نتایج نشان داد که تلقیح محیط های فوق با باکتری و قارچ میانگین مقدار فسفر محلول در آب را در طول مدت زمان ۸ روز تقریباً دو برابر افزایش داد و pH نیزکاهش چشمگیری داشت. اثر اضافه نمودن مواد آلی به خاک نیز باعث بهبود خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاک می شود. استفاده از مواد آلی نیز باعث افزایش واکنش پذیری خاک فسفات و فراهمی بیشتر فسفر می شود. در حین تجزیه مواد آلی، فعالیت میکروبی افزایش می یابد و در نتیجه مقدار زیادی اسیدهای آلی و مواد هومیکی تولید می شود و باعث اسیدی شدن خاک فسفات و فراهمی فسفر می شود (۲۸). اشتورم و همکاران (۲۹) نشان دادند که در اثر اضافه کردن اسیدهای آلی یافت شده در تراوشات ریشه گیاهان (اسیدهای سیتریک،اگزالیک و مالیک) به یک خاک آهکی، در شرایط کمبود فسفر، فراهمی فسفر افزایش یافت.

شکل (۶) نشان می دهدکه با اعمال سنگ فسفات به خاک فسفر

محلول نسبت به تیمارهای بدون سنگ فسفات افزایش یافته است. که نشان می دهد افزودن سنگ فسفات اثرمثبتی در آزادسازی فسفر محلول داشته بطوری که این افزایش در همه تیمارها مشاهده می شود ولی در تیمار *آسپرژیلوس نایجر* + کود سبز + سنگ فسفات(As+A+P) قابل توجه تر بوده است. بطوری که توانست فسفر محلول را در پایان دوره نسبت به سنگ فسفات ۶/۳۱ درصد و نسبت به تیمار شاهد ۵۸ درصد افزایش دهد. وقتی کودهای فسفره با مواد آلی مخلوط می شوند باعث افزایش فراهمی فسفر نسبت به کاربرد کودهای فسفره به تنهایی می شود. به نظر می رسد که در حین تجزیه مواد آلی، اسیدهای آلی و مواد هومیکی تولید می شود که باعث کاهش pH و مانع تثبیت فسفر در خاک می شوند. بنابراین با کاربرد مواد آلی در خاک فراهمی فسفر معدنی افزایش می یابد .ناریانسامی و بیسواس(۲۱) همچنین عنوان کردند افزودن ماده آلی از طریق کاهش pH و هم به عنوان منبع کربن و محرک رشد میکروارگانیزم ها می تواند شرایط را برای افزایش فسفر محلول مطلوب سازد. والن و چانگ (۳۲) بیان کردند که استفاده دراز مدت از مواد آلی باعث نگهداری فسفر با پیوندهای کم انرژی تر شده و قابلیت فراهمی آن در خاک را افزایش می دهد. در آزمایشی که جایادی و همکاران (۱۴) بر روی حلالیت سنگ فسفات توسط ریزجانداران حل کننده فسفات انجام دادند به این نتیجه رسیدند که قارچ *آسپرژیلوس نایجر* باعث کاهش pH خاک و در نتیجه حلالیت فسفر شد که این کاهش به علت تولید اسیدهای آلی و تنفس ریزجانداران است. ریزجانداران حل کننده فسفات با تولید اسیدهای معدنی (اسید کربنیک و اسید سولفوریک)، اسیدهای آلی (سیتریک، بوتیریک، اگزالیک، لاکتیک) و تولید فسفاتاز باعث انحلال فسفات معدنی و آلی می شوند (۳۱). در آزمایشی که بوسیله ساگو و همکاران (۲۵) انجام شد، اثر قارچ بر فراهمی فسفر با منابع مختلف خاک فسفات مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش تولید اسید سیتریک موجب کاهش pH و افزایش غلظت فسفر محلول در آب از خاک فسفات شد و در اکثر تیمارها روند کاهش pH و افزایش فسفر محلول در آب گزارش شد.

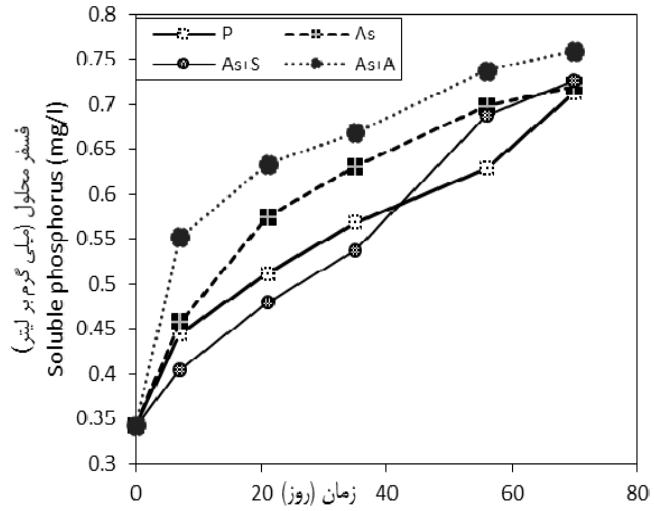
اثر تیمارها و زمان نگهداری بر فسفر قابل دسترس خاک

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که اثرات تیمار و زمان و همچنین اثر متقابل تیمار و زمان بر فسفر قابل دسترس خاک در سطح ۱ درصد معنی دار است. شکلهای (۷) و (۸) اثر تیمارها بر فسفر قابل دسترس خاک و تغییرات آن در طول زمان نگهداری نمونه‌ها را نشان می دهد. با توجه به شکل(۷) در طول زمان نگهداری فسفر قابل دسترس خاک افزایش یافته است که در تیمارهای مختلف این افزایش متفاوت بوده است. با توجه به شکل بیش ترین میزان افزایش فسفرقابل دسترس در دوره ۷۰ روزه مربوط تیمار *آسپرژیلوس نایجر* + کود سبز (As+A) و به مقدار ۳۲/۸۳ میلی گرم بر کیلوگرم بود. این در حالی است که تیمارهای *آسپرژیلوس نایجر* (As) و کود سبز (A) به تنهایی تأثیر کمتری روی فسفر قابل دسترس داشته اند. با توجه به شکل (۸) تیمار سنگ فسفات (P) توانست فسفر قابل جذب خاک را ۲/۰۲ میلی گرم بر کیلو گرم طی دوره ۷۰ روزه افزایش دهد. لذا این طبیعی است که استفاده از سنگ فسفات تأثیر بیش تری در افزایش فسفر قابل جذب خاک نسبت به تیمارهای فاقد سنگ فسفات داشته باشد , بطوریکه بیشترین فسفر قابل جذب در تیمار *آسپرژیلوس نایجر* + کود سبز + سنگ فسفات (As+A+ P) و به مقدار ۸/ ۳۵میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد.



شکل۵- اثر تیمارها و زمان بر فسفر محلول خاک بدون کاربرد سنگ فسفات

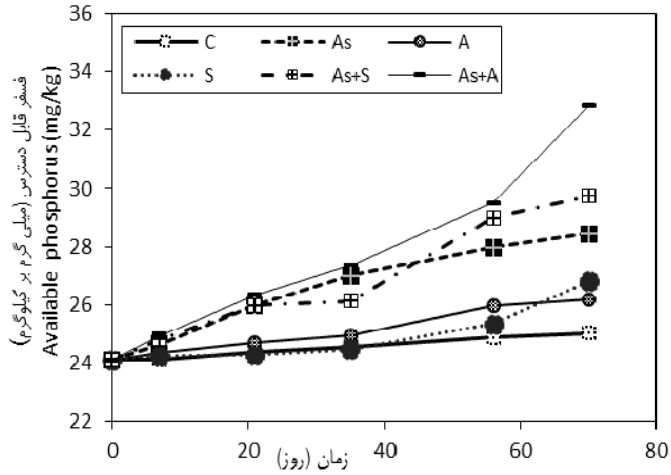
Figure 5- Effect of the treatments and incubation time on soluble phosphorus with out the use rock phosphate



شکل٦- اثر تیمارها و زمان بر فسفر محلول خاک همراه با کاربرد سنگ فسفات

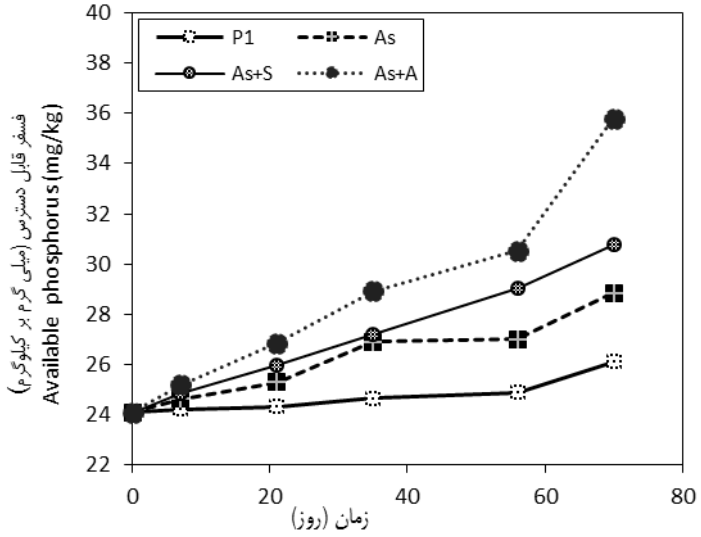
Figure 6- Effect of the treatments and incubation time on soluble phosphorus with the use of rock phosphate

ریز جانداران حل کننده فسفات با معدنی کردن فسفر آلی در خاک از طریق حل کردن فسفات‌های نامحلول باعث افزایش فراهمی فسفر برای گیاه می شوند(۶). برخی پژوهش ها نشان می دهد که افزودن ماده آلی به خاک باعث افزایش مقدار شکل های فراهم فسفر در خاک می شود(۱, ۱۰). گایند (۹) با کاربرد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* بر روی بقایای آلی مختلف نظیر کود مرغی, کود گاوی و کاه و کلش دریافت که فسفر قابل استخراج با بی کربنات سدیم (روش اولسن) در این تیمارها نسبت به شاهد تا ۳۲ درصد افزایش یافت. ناریانسامی و بیسواس(۲۱) تأثیر کمپوست را بر فراهمی فسفر از خاک فسفات مورد بررسی قرار دادند. در این آزمایش۴ نوع خاک فسفات با غلظت کم فسفر انتخاب و با کمپوست کاه برنج (در دو سطح) مخلوط شدند، نتایج این آزمایش نشان داد با افزودن کمپوست میزان فسفر قابل جذب (اُلسن) اندک بود ولی با افزایش زمان انکوباسیون، به طور معنی داری مقدار آن افزایش یافت. میزان فسفر کل و فسفر محلول در سیترات و فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی نیز در حضور تیمار کمپوست افزایش یافته بود. پژوهشگران علت این افزایش را اسیدهای آلی ازجمله اسید سیتریک، اسید اگزالیک، اسید تارتاریک دانستند که در ضمن تجزیه مواد آلی تولید می شوند. در مطالعه ۹ ماه خوابانیدن خاک با موادآلی و کودهای شیمیایی (دارای مقادیر یکسان فسفر) مقدار فسفر قابل دسترس در زمان های مختلف در تیمار موادآلی بیش تر از تیمار کودهای شیمیایی بود (۲۰). اسیدهای آلی حاصل از تجزیه موادآلی با جذب بر روی سطوح فسفات های کلسیم و اشغال مکان های فعال به عنوان هسته هایی برای رشد کریستال های جدید از تشکیل این رسوبات جلوگیری می کنند. افزون بر این اسیدهای آلی با ایجاد کمپلکس با کاتیون های کلسیم فعالیت این یون ها را کاهش می دهد (۷).



شکل۷- اثر تیمارها و زمان بر فسفر قابل دسترس خاک بدون کاربرد سنگ فسفات

Figure7 - Effect of the treatments and incubation time on available phosphorus with out the use rock phosphate



شکل۸- اثر تیمارها و زمان بر فسفر قابل دسترس خاک همراه با کاربرد سنگ فسفات

Figure 8- Effect of the treatments and incubation time on available phosphorus with the use rock phosphate

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ریزجانداران حل کننده فسفات و مواد آلی باعث کاهش معنی دار pH و افزایش هدایت الکتریکی، فسفر محلول و فسفر قابل دسترس خاک شد. بطوری که بیشترین فسفر محلول و قابل دسترس خاک در تیمار As+P + A: *آسپرژیلوس نایجر* + سنگ فسفات + کود سبز مشاهده شد که توانست فسفر محلول و قابل دسترس را به ترتیب نسبت به شاهد به ترتیب ۵۸ درصد و ۴۳ درصد افزایش دهد. این نتایج اهمیت مواد آلی و قارچ آسپرژیلوس را در آزاد سازی فسفر خاک نشان داد به نظر میرسد که قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و کود سبز توان حل کردن فسفر خاک را دارند و میتوان از آنها در خاکهایی که مقدار فسفر کل بالایی داشته اما قابل دسترس برای گیاهان نمیباشد استفاده نمود. به هر حال نیاز است تا یک آزمایش گلدانی نیز صورت گیرد و با آزمایش انکوباسیون مقایسه گردد تا بتوان نتایج بهتری را بدست آورد. در مورد تاثیر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* بر فسفر خاک نیز در خاکهای مختلف از نظر شوری و pH و تعیین وضعیت بقاء آن پس از برداشت محصول نیز تحقیقاتی صورت گیرد.

منابع

1-Abbaspour A., and Golchin A. 2011. Immobilization of heavy metals in a contaminated soil in Iran using di-ammonium phosphate, vermicompost and zeolite. Environ Earth Sci 63:935–943.

2- Ajudanzadeh M. 2005. Thesis "Effect of organic materials and different levels of quality, the physicochemical properties of soil and yield of potatoes", University of Zanjan. (in Persian)

3-Biyabanaki F., and Hossin pour A. 2007. P Release kinetics and correlation coefficient of kinetic models with some soil and vegetation indices in soils of Hamadan. journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, number 42(B) , 491-503P.(in Persian)

4-Bojinova D., Velkova R., and Ivanova R. 2008. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus Niger*. Bioresource Technology 99: 7348–7353.

5-Chen Y.P., Rekha P.D., Arunshen A.B., Lai W.A., and Young C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl. Soil Ecol. 34:33-41.

6- Chen J., Weng Y. E., and Wang Y. P. 1994. Effects of organic fertilizers addition on P sorption characteristics of soils. Journal of Chinese Agricultural Chemical Society 32 (3): 332-346.

7-Cooperband L. R., and Good L.W. 2002. Biogenic phosphate minerals in manure: Implications for phosphorus loss to surface waters. Environmental Science Technology 36:5075-5082.

8-Fageria N. K. 2009. The use of nutrients in plants. Taylor & Francis Group, CRC Press, 430p.

9-Gaind S. 2014. Effect of fungal consortium and animal manure amendments on phosphorus fractions of paddy-straw compost. International Biodeterioration & Biodegradation, Volume 94, October 2014, Pages 90-97.

10-Gale P. M., Mullen M. D., Cieslik C., Tyler D. D., Duck B. N., Krishner M., and McClure J. 2000. Phosphorus

distribution and availability in response to dairy manure applications. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 31:553-565.
11- Ghorbani H. 2007. A review of bio-fertilizers in Iran and their role in protecting the environment and public health. Pages 202 to 217. Iran is the second national conference on ecological agriculture. Gorgan. (in Persian)
12- Jalali M., and Kolahchi Z. 2005. Phosphorus in the soil by adding different amounts of phosphorus in soils of Hamadan province. Journal of Soil and Water Sciences, Volume 19, Number 1.pp 53 to 60. (in Persian)
13- Javid S., and Rowell D.L. 2002. A laboratory study of effect of time and temperature on the decline in Olsen P following phosphate addition to calcareous soils. Soil Use Management 18: 127– 134.
14-Jayadi M., and Baharuddin I. B. 2013. In vitro selection of rock phosphate solubility by microorganism from Ultisols in South Sulawesi, Indonesia. American Journal of Agriculture and Forestry. 1(4):6873.
15-Karthikeyan K.G., Kalbasi M., and Miller P.S. 2005. Nitrogen and solution dynamics in soils receiving chemically treated dairy manure. Trans. ASAE 48:601-610.
16- Kareem S. O., Akpan I., and Alebiowu O. O. 2010 "Production of citric acid by Aspergillus niger using pineapple waste Malaysian". Journal of Microbiology, Vol 6(2) 2010, pp. 161-165.
17-Khoshgoftarmanesh M.A. 2007. The relative effectiveness of different amounts of phosphorus in corn (*Zea mays L*), A.H. (2007) Principles of plant nutrition ", printing, Isfahan University Press, 462 p. (in Persian)
18- Kovar JL., and Barber V. 1998. Phosphorus supply characteristics of 33 soils as influenced by seven rates of phosphorus addition. Soil Science Society of American Journal 52: 160-165.
19- Kucey R.M., Janzen H.H., and Leggett M.E. (1989) "Microbially mediated increases in plant-available phosphorus". Advances in Agronomy 42:199-228.
20-Laboski C. A. M., and Lamb J. A. 2003. Changes in soil test phosphorus concentration after application of manure or fertilizer. Soil Sci. Soc. Amer. J. 67:544-554.
21-Naryanasamy G., and Biswa D.S. 2006. Rock phosphate enriched compost: An approach to improve low-grade Indian rock phosphate. Bioresource Technology, 97(18):2243-2251.
22- Olsen S. R., Cole C. V., Watanabe F. S., and Dean L. A. (1974)."Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate". United States Department of Agriculture Circular.939: 1-19.
23-Ramaekers L., Remans R., Rao I. M., Blair M. W., and Vanderleyden J. 2010. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants: Review. Field Crops Research, Elsevier, pp 1-8.
24- Rees R. M., Ball B. C., Campbell C. D. and Watson C. A. (2001) "Sustainable management of soil organic matter". British Society of Soil Science. CAB pub.
25-Sago C.I., Ando T., Kouno K., and Nagaoka T. 1998. Relative importance of porotons and solution calcium concentration in phosphate rock dissolution by organic acid. Soil Science 44:617-625.
26-Salardini A. 2009. Soil fertility ", Eighth Edition, published by Tehran University, Tehran.
27-Shiv M., Lal S., Sanjay K., Purnima S., Paras N.A., and Rasik R. 2011. Phosphate solubilizing ability of two Arctic *Aspergillus Niger* strains. Polar Research 30.
28-Stamford N.P., Silva J. A., Freitas A. D. S., and Araujo Filho J. T. 2002. Effect of sulphur inoculated with Acidithiobacillus in a saline soil grown with Leucena and mimosa tree legumes. Bioresource Technology 81: 53-59.
29- Ström L., Owen A.G., Godbold D.L., and Jones D.L. (2005) "Organic acid behaviour in a calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling". Soil Biol. Biochem. 37: 2046–2054.
30-Sundara B., Natarayan V., and Hari K. 2001. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on soil available Pstatus and sugarcane development on a tropical Vertisol. Proc. Interaction Soc. Sugarcane Technol. 24: 47-51.
31-Vance C., Uhde-Stone C., and Allan D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytol. 157: 423-447.
32-Whalen J. K., and Chang C. 2002. Phosphorus sorption capacities of calcareous soils receiving cattle manure applications for 25 years. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 33:1011-1026.
33-Xiao C., Zhang H., Fang Y., and Chi R. 2013. Evaluation for rock phosphate solubilization in fermentation and soil–plant system using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Aspergillus Niger* WHAK1. Applied Biochemistry and Biotechnology 169(1): 123-133.
34-Zeroual Y., Chadghan R., Hakam A., and Kossir A. 2012. Biosolubilization of Mineral Insoluble Phosphates by Immobilized Fungi (*Aspergillus Niger*) in Fluidized Bed Bioreactor. J Biotechnol Biomaterial 2012, S6.

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 2, May.-Jun. 2017, p. 597-608

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۶، ص. ۶۰۸-۵۹۷

Effects of *Aspergillus Niger* and Green Manure on Soil Phosphorus Solubility in the Incubation Conditions

A. Ehsani nezhad[1]*- A. Abbaspour[2]- H. R. Asghari[3]- H.R. Samadlouie[4]

Received: 01-06-2016
Accepted: 17-11-2016

Introduction: Phosphor (P) is the second nutrient element after nitrogen mostly required by plant. P is the main component of nucleic acid, phospholipid, ATP and some coenzymes. The effectiveness of phosphate fertilizer application is only about 15% - 20% and 10 – 25%, based on the different references.Rock phosphate (RP) as a source of P is not expensive, but its availability of P is low. Solubility of RP can be increased by phosphate solubilizing microorganisms. Increasing RP solubility by microorganisms is due to the lowering of pH and/or organic acid excretion. Fungi have been reported to possess greater ability to solubilize insoluble phosphates than bacteria. Among the fungal genera with the phosphate solubilization ability, there are *Aspergillus* and *Penicillium*. *Aspergillus Niger* convert insoluble phosphates into soluble forms through the processes of acidification, production of organic acids, production of acid and alkaline phosphatases, and the release of H^+ .These organic acids can either dissolve phosphates as a result of anion exchange or can chelate Ca, Fe or Al ions associated with the phosphates. The aim of this study was to investigate the effect of *Aspergillus Niger* and green manure on soil P solubility in the incubation conditions.

Materials and Methods: To investigate the effect of *Aspergillus Niger* and green manure on soil phosphorus availability, an experiment in a completely randomized design with three replications was conducted. The treatments were applied over a period of 70 days and were repeated at 3 incubations. The treatments were included C: control (50 g soil), As: *Aspergillus Niger* (50 ml/ kg), A: Green manure (1% weight of the soil), S: Sucrose (1 g/kg soil), P: Rock phosphate (150 kg/ha), As + A: *Aspergillus niger* + Green manure, As + S: *Aspergillus Niger* + Sucrose, As+P: Aspergillus niger + Rock phosphate, As + S + P: Aspergillus niger + Sucrose+ Rock phosphate , and As + A + P *Aspergillus niger*+ Green manure +Rock phosphate . Soils were air-dried and crushed to pass through a 2-mm sieve. Treatments were then applied to 50 g of soil and the treated samples were moistened to the field capacity (FC). The moisture of containers was kept near FC soil moisture content throughout the experiment by periodically weighing and replenishing evaporated water. At intervals of 7, 21, 35, 51 and 70 days, the samples were taken and after air drying, pH, EC, available soil phosphorus by Olsen method and soluble phosphorus were measured. The statistical analysis of all data obtained from the experiments was performed using the MSTAT-C software. The mean comparison was performed using Least Significant Difference (LSD) test at 5% level and drawing graphs using Excel software.

Results and Discussion: The results showed that all treatments had a significant effect on the measured parameters at 1% probability level. The effect of treatments and incubation Times on soil pH showed that all treatments were able to reduce soil pH. The greatest decrease was observed in *Aspergillus Niger* + Green manure (As + A) treatment that could reduce the pH by 0.59 unit. Usually, green manure decreases soil pH through decomposition and release carbon dioxide and organic acids. *Aspergillus Niger* also reduces pH and thus increases the solubility of soil phosphorus through the production of the metabolites and organic acids and microbial respiration. The effects of the treatments and incubation time on soil electrical conductivity showed that all treatments were able to increase soil electrical conductivity. Most of this increase was related to *Aspergillus Niger*+ Rock phosphate+ Green manure (As +P+ A) treatment .This increase was probably due to inorganic compounds found in green manure. The effects of the treatments and incubation time on soil available phosphorus and solube phosphorus showed that all treatments were able to increase them. Most of the soluble and available phosphorus amounts were observed in As +P+ A treatment and the amounts of increase resulting from this treatment for soluble and available phosphorus were 0/28 mg/l and 10/79 mg/kg, respectively. However, the green manure treatments and aspergillus alone increased soil soluble phosphorus, but with treatment of *Aspergillus Niger* (As) in green manure (A) observed that the amount of phosphorus in the soil solution was further enhanced. Organic acids resulting from the decomposition of organic matter by adsorption

1- Soil Science Department, College of Agriculture, Shahrood University
(*-Corresponding Author Email: Azadeh.ehsani.az@gmail.com)
2-Associate Professor, College of Agriculture,Shahrood University
3-Associate Professor, Vollege of Agriculture,Shahrood University
4-Assistant Professor, Vollege of Agriculture,Shahrood University

onto calcium phosphate surfaces and occupy the active sites such as nuclei for the formation of these deposits, prevent the growth of new crystals. These organic acids, in addition to the creation of the complex with calcium cations, reduce the activity.

Conclusions: The results of this study showed that use of phosphate solubilizing microorganisms and organic matter led to the significant decrease in pH and increase in electrical conductivity, dissolved phosphorus and available phosphorus in soil.. However, to obtain more accurate results, it is better to do a pot experiment as well.

Keywords: Green Manure, Organic acids, Phosphate solubilizing fungi, Soil phosphorus