نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۶، بهمن - اسفند ۱۳۹۲، ص. ۱۰۹۹-۱۰۹۰

Journal of Water and Soil
Vol. 27, No. 6, Jan.-Feb. 2014, p. 1090-1099

تاثیر جدایه‌های آسپرژیلوس بر هیدرولیز فسفر آلی خاک (اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم)

تکتم جواهری[1*]- امیر لکزیان[2]- پریسا طاهری[3]- رضا خراسانی[4]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۸/۷
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۶/۳

چکیده

بخش عمده فسفر خاک به شکل آلی است. اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم از جمله ترکیبات آلی فسفردار خاک می‌باشند. قارچ‌های خاک نقش مهمی در تبدیل این ترکیبات به فرم معدنی ایفا می‌کنند. در میان قارچ‌ها، آسپرژیلوس یکی از انواع موثر در هیدرولیز ترکیبات آلی می‌باشد. به منظور مطالعه توانایی جدایه‌های آسپرژیلوس بر هیدرولیز بسترهای اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل ۵ جدایه قارچ (۴ جدایه آسپرژیلوس و جدایه تریکودرما هارزیانوم) و تیمار شاهد (فاقد قارچ) و دو نوع ترکیب آلی فسفر (اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم) بودند. فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی، تغییرات pH محیط کشت و میزان فسفر معدنی حاصل از هیدرولیز جدایه‌های فوق، که در محیط کشت PDB در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد رشد داده شده بودند،۱۴ روز پس از تلقیح اندازه‌گیری شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که کلیه جدایه‌های قارچ در معدنی کردن فسفر آلی از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری داشتند. از میان جدایه‌های مورد مطالعه، بیشترین میزان معدنی شدن فسفر مربوط به قارچ آسپرژیلوس نیجر (A_{15}) بود. نتایج نشان داد که نوع بستره آلی بر توانایی جدایه‌ها جهت هیدرولیز تاثیر می‌گذارد. جدایه‌ها در محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم نسبت به اسید فیتیک فسفر معدنی بیشتری آزاد کردند. همچنین میزان فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌ها در محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم نسبت به اسید فیتیک بیشتر بود. در بین اکثر جدایه‌ها کاهش pH محیط حاوی اسید فیتیک نسبت به گلیسرو فسفات سدیم بیشتر صورت گرفت. فسفر معدنی محیط کشت جدایه‌های آسپرژیلوس حاوی گلیسرو فسفات سدیم با فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی همبستگی مثبت با (R^2 مساوی۰/۷۲ و ۰/۶۷ به ترتیب) و با pH محیط کشت همبستگی منفی و معکوس و R^2 مساوی ۰/۷۹داشت.

واژه های کلیدی: فسفر معدنی، هیدرولیز، آسپرژیلوس، اسید فیتیک، گلیسرو فسفات سدیم

مقدمه

فسفر بعد از نیتروژن مهمترین عنصر غذایی مورد نیاز گیاه است که با وجود توزیع گسترده آن در طبیعت قابلیت جذب آن در خاک‌ها معمولا کم است (۱). فسفری که به صورت کود وارد خاک می‌شود مقدار زیادی از آن به سرعت از دسترس گیاه خارج می‌گردند و در بخش‌های معدنی خاک انباشته می‌شوند که علت آن ناشی از فرآیندهای شیمیایی جذب و رسوب است و مقداری از آن نیز در مواد آلی خاک غیر متحرک می‌گردند (۲۰). بخش قابل ملاحظه‌ای از فسفر کل خاک‌های حاصلخیز (حدود ۵۰ تا ۸۰ درصد) در بخش‌های آلی قرار دارد (۱۵). عدم وجود روش‌های تحلیلی مناسب برای فسفر آلی خاک به همراه کمبود آگاهی از میزان و مکانیسم‌های معدنی شدن فسفر آلی منجر به شیوه‌های نادرست مدیریتی شده است که موجب شده که این منبع عظیم فسفر نادیده گرفته شود. اهمیت فسفرآلی خاک به عنوان یک منبع برای فسفر گیاه بستگی به میزان آزاد شدن فسفر معدنی دارد (۱۱). اینوزیتول پنتا - هگزا فسفات‌ها (فیتات) و مشتقات آن (فیتات کلسیم و منیزیم) و همچنین گلیسروفسفات سدیم از جمله ترکیبات فسفر آلی خاک محسوب می‌شوند. فراوانی فیتات‌ها و دیگر فسفات‌های آلی در خاک به دلیل حلالیت پایین آنهاست، همچنین این ترکیبات اتصالات محکمی با فاز جامد خاک دارند و این باعث پایداری بسیار بالای آنها در خاک می-

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: niko5934@yahoo.com)
۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

شود (۲۶). ترکیبات فسفر آلی بایستی توسط آنزیم‌های فسفاتاز، فیتاز برای آزادشدن فسفر معدنی در خاک و قابلیت دسترسی پیدا کردن برای گیاه هیدرولیز شوند. پروسه‌های متنوع میکروبی در متحرک کردن فرم‌های آلی فسفر دخالت دارند و کاربردشان در تولید محصول به خصوص در خاک‌های خشک چشمگیرتر است (۱۸). تعدادی از ریزجانداران آزادزی در خاک هستند که توانایی تولید آنزیم‌های برون سلولی و درون سلولی مانند فسفاتاز و فیتاز را دارند (۱۱). پنیسیلیوم و آسپرژیلوس از جمله قارچ‌ها و سودوموناس مالی و باسیلوس از جمله باکتری‌های حل کننده فسفات هستند که میزان معدنی شدن فسفر توسط آنها بستگی به فعالیت میکروبی و فعالیت فسفاتازها دارد (۱۹). قارچ‌های حل کننده فسفات نسبت به باکتری‌ها جهت تولید آنزیم‌های فسفاتاز و معدنی کردن فسفر آلی خاک برتری دارند، زیرا هیف‌های آنها می‌توانند فواصل دورتری از خاک را به آسانی در مقایسه با باکتری‌ها طی کنند (۱۲). توانایی حلالیت قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها هم در محیط مایع و هم در محیط کشت جامد (آگاردار) نیز بیشتر است، هیف‌های قارچی در محیط کشت مایع به ذرات معدنی فسفر متصل شده که این توسط میکروسکوپ الکترونی قابل رویت است در حالیکه باکتری‌ها اینطور نیستند (۷). طی تحقیقی در رابطه با توانایی باکتری‌ها و قارچ‌ها جهت هیدرولیز ترکیبات آلی گزارش شد که قارچ-های آسپرژیلوس و پنیسیلیوم نسبت به باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس مالی فعالیت فسفاتاز بیشتری دارند (۸). از مایه تلقیح برخی از قارچ‌ها می‌توان برای بهره برداری از فسفر آلی خاک برای رشد گیاه استفاده کرد، که به این وسیله می‌توان کاربرد کودهای فسفردار را جهت تولیدات گیاهی به حداقل رساند. طی بررسی صورت گرفته در شرایط آزمایشگاهی، قارچ تریکودرما هارزیانوم به عنوان گونه برتر جهت هیدرولیز ترکیبات آلی فسفردار معرفی شد (۵). یافته‌های حاصل از تحقیق انجام شده بر توانایی قارچ‌های مختلف (آسپرژیلوس، امرسیلا، پنیسیلیوم) در هیدرولیز اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم، حاکی از این بود که قارچ آسپرژیلوس نیجر توانایی بیشتری در این زمینه دارد و این جدایه به عنوان جدایه برتر شناسایی شد (۲۷). همچنین گزارش شد که حضور قارچ پنیسیلیوم پورپوروجینیوم در اکوسیستم‌های خشک برای گیاه مفید است زیرا این قارچ آنزیم فسفاتاز و فیتاز تولید می‌کند که در فراهمی فسفر قابل دسترس موثر است و جذب فسفر و رشد گیاه ارزن را در مناطق خشک افزایش می‌دهد (۲۸). در مطالعه دیگر که بر قابلیت دسترسی فسفر توسط قارچ‌ها از منابع آلی صورت گرفت، قارچ آسپرژیلوس تریوس بیشترین پتانسیل را برای معدنی کردن فسفر آلی داشت و به دنبال آن آسپرژیلوس تاماری، آسپرژیلوس نیجر، تریکودرما هارزیانوم و پنیسیلیوم بریویکوم پکتیوم به ترتیب بودند. همچنین میزان آنزیم‌ها با میزان فسفری که معدنی شده بود همبستگی داشت (۱۸). نتایج تحقیق طرفدار و مارچنر (۲۴)، حاکی از این بود که تغذیه فسفر توسط گندم در حضور فیتات اضافه شده به خاک هنگامی که با قارچ میکوریزا و آسپرژیلوس فومیگیتوس تلقیح شود افزایش می‌یابد. در تحقیقی دیگر کارایی گیاه و قارچ جهت هیدرولیز بستره های آلی فسفر مقایسه شد، نتایج نشان داد که آنزیم فسفاتاز میکروبی از فسفاتاز گیاهی موثرتر است بطوریکه قارچ‌ها در هیدرولیز فیتین سه برابر و در هیدرولیز لکتین دو برابر موثرتر بودند. اما کارایی آنها در هیدرولیز گلیسرو فسفات سدیم نسبت به گیاه یکسان بود (۲۳). بر پایه آنچه که از پژوهش‌های گوناگون بر می‌آید، قارچ‌های خاک در تبدیل ترکیبات آلی فسفر به فرم معدنی و قابل استفاده گیاه بسیار موثرند، بنابراین جهت بهره برداری فسفر آلی خاک، می توان از آنها استفاده کرد. طبق تحقیقات صورت گرفته، آسپرژیلوس‌ها در این رابطه بسیار حائز اهمیت هستند. بر این اساس، هدف این پژوهش بررسی کارایی جدایه‌های آسپرژیلوس استان خراسان رضوی جهت هیدرولیز ترکیبات آلی فسفر دار در شرایط آزمایشگاهی بوده است و به دنبال آن فعالیت آنزیم فسفاتاز آسپرژیلوس ها در حضور این ترکیبات آلی و رابطه آن با میزان هیدرولیز نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جهت مطالعه توانایی هیدرولیز ترکیبات آلی فسفر توسط جدایه‌های آسپرژیلوس، آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل ۴ جدایه آسپرژیلوس به همراه یک جدایه از تریکودرما هارزیانوم، و تیمار شاهد (فاقد قارچ) بودند. گلیسروفسفات سدیم به میزان ۱/۵۵ گرم در لیتر و فیتات سدیم (اسید فیتیک) به میزان ۰/۷۷ گرم در لیتر بعد از استریل شدن محیط کشت مایع به صورت مجزا اضافه شدند، با توجه به درصد فسفر در هر ترکیب آلی سعی شد تا میزان فسفر در هر دو ترکیب برابر انتخاب شود. جدایه‌ها در محیط کشت PDA به مدت ۵ روز رشد داده شدند و سپس دیسک‌هایی با قطر ۸ میلی‌متری برای تلقیح به۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع PDB که حاوی ترکیبات آلی فسفر بودند، استفاده شد. ظروف حاوی محیط کشت مایع به همراه قارچ‌ها داخل انکوباتور در دمای ۲۸ تا۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و ۱۴ روز پس از تلقیح فسفر معدنی موجود در محیط کشت اندازه گیری شد و علاوه بر آن فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی و تغییرات pH محیط نیز اندازه گیری شدند. برای اندازه‌گیری فسفر محلول از روش رنگ سنجی و از مولیبدات آمونیوم استفاده شد (۱)، که برحسب میلی گرم در لیتر گزارش گردید.

برای اندازه گیری آنزیم های فسفاتاز از روش طباطبایی و بریمنر، (۲۲) استفاده شد. ۱ میلی لیتر عصاره محیط کشت مایع را برداشته و به آن ۴ میلی لیتر MUB (بافر اسیدی با pH= ۶/۵ جهت اندازه-گیری فسفاتاز اسیدی و بافر قلیایی با pH= ۱۱/۵ جهت اندازه‌گیری

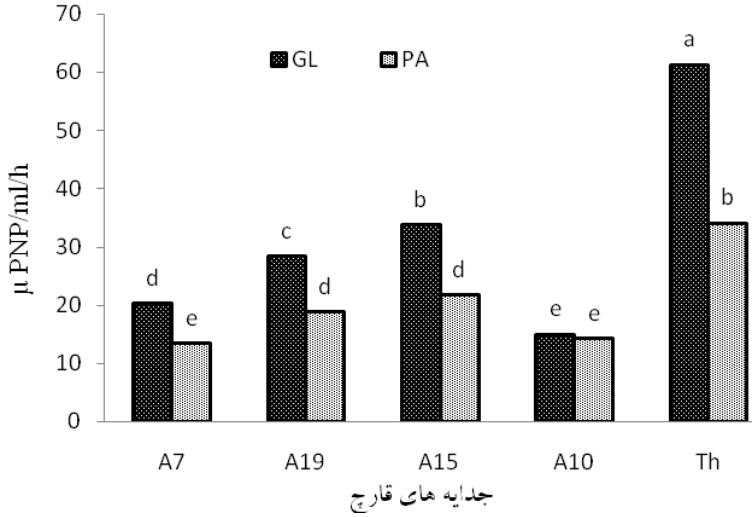
فسفاتاز قلیایی) و ۱ میلی لیتر محلول پارانیتروفنیل فسفات اضافه شد. سپس ظروف حاوی این مواد در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. بعد از یک ساعت به محلول فوق ۱ میلی لیتر محلول کلرید کلسیم نیم مولار و ۴ میلی لیتر سود نیم مولار اضافه شد. در این حالت در نتیجه فعالیت آنزیم، تبدیل پارانیتروفنیل به پارانیتروفنل که زرد رنگ است صورت گرفت و با تعیین شدت رنگ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر، فعالیت فسفاتاز اندازه گیری شد.

داده‌های به دست آمده در پایان آزمایش با کمک نرم افزارهای MSTATC وExcel مورد تجزیه و تحلیل‌های آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

فعالیت فسفاتاز اسیدی جدایه‌های قارچ در دو محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم و اسید فیتیک، ۱۴ روز پس از تلقیح در شکل ۱ نشان داده شده است. در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم، بین اکثریت جدایه‌ها از لحاظ فسفاتاز اسیدی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در میان جدایه‌های آسپرژیلوس، جدایه A_{15} بیشترین و جدایه A_{10} کمترین فعالیت فسفاتاز اسیدی را نشان دادند. اما در مقایسه کلی بین جدایه‌ها، تریکودرما هارزیانوم (Th) بیشترین و جدایه‌های A_{10} کمترین فعالیت را داشتند. در محیط حاوی اسید فیتیک، جدایه‌های A_{15} و A_{19} بیشترین و جدایه A_{10} کمترین فعالیت آنزیمی را داشتند اما در مقایسه کلی جدایه‌ها، Th بیشترین فعالیت آنزیمی را در محیط نشان داد. آسری و همکاران در طی بررسی که بر روی قارچ‌های مختلف از جمله گونه‌های مختلف *Aspergillus*، *Penicillium*، *Pseudeurotium zonatum* و *Trichoderma* از لحاظ فعالیت فسفاتاز اسیدی انجام دادند، دریافتند که بین فعالیت فسفاتاز اسیدی قارچ‌ها اختلاف معنی داری وجود دارد، قارچ تریکودرما هارزیانوم، بیشترین فعالیت فسفاتاز اسیدی را در میان قارچ‌های مورد بررسی داشت. همچنین در میان قارچ‌های آسپرژیلوس بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به گونه *Aspergillus parasiticus* بود که در زمان‌های مختلف بیشترین فعالیت فسفاتاز اسیدی را دارا بود (۵). پنکا و همکاران (۴) دریافتند که میزان فعالیت فسفاتاز اسیدی قارچ‌ها در محیط کشت مایع بیشتر از محیط‌های دیگر و حتی از عصاره میسیلیومی می‌باشد و بیشترین فعالیت فسفاتاز اسیدی در قارچ‌های آسپرژیلوس، پنیسیلیوم، فوزاریوم و نروسپورا مشاهده شده است. دلیل آن ممکن است، تفاوت داشتن جدایه‌ها از لحاظ ویژگی-های ژنتیکی و مورفولوژیکی باشد. قارچ‌ها موجوداتی متنوع‌اند و با هم اختلاف زیادی دارند. وجه مشترک آنها نحوه تغذیه آنهاست که همه آنها هتروتروف هستند. قارچ‌ها پس از ترشح آنزیم‌های هضم غذا، به کمک آنها مواد غذایی محیط خود را شکسته و به صورت مواد ساده و محلول در آب در می‌آورند که مقداری از آن جذب سلول‌های آنها می‌شود. قارچ‌ها در تماس با مولکول‌های آلی، آنزیم‌های هضم کننده را آزاد می‌کنند که سبب هیدرولیز آنها می‌شود که از این لحاظ با هم اختلاف دارند (۳). یکی دیگر از عواملی که سبب تغییر فعالیت آنزیمی بیشتر جدایه‌ها شده است ممکن است بخاطر این باشد که جدایه‌ها از لحاظ تولید میزان اسیدهای آلی متفاوتند در نتیجه در محیط آنها pH متفاوتی ایجاد می‌شود که خود این عامل نیز بر فعالیت فسفاتاز آنها تاثیر گذاشته و سبب اختلاف در این زمینه می‌شود (شکل ۳). همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در رابطه با تاثیر نوع ترکیب آلی بر فعالیت فسفاتاز اسیدی، جدایه‌ها در محیط گلیسرو فسفات سدیم نسبت به اسیدفیتیک فعالیت فسفاتاز اسیدی بیشتری داشتند. نوع و غلظت بستره آلی از عواملی است که بر روی خصوصیات متابولیکی ریزجانداران اثر دارد و باعث ایجاد اختلاف در فعالیت متابولیکی آنها از جمله آنزیم‌ها می‌شود (۸). در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم رشد قارچ‌ها با سرعت بیشتری نسبت به زمان صورت گرفت و حتی طبق شواهد ظاهری اسپوردهی قارچ‌ها نیز سریعتر بود. نتایج حاصل از مطالعه فیترتین و همکاران (۸) حاکی از این بود که، فعالیت فسفاتاز اسیدی ریزجانداران، باسیلوس سوبتی لیس، سودوموناس مالی، آسپرژیلوس نیجر، پنیسیلیوم در محیط کشت حاوی اسید فیتیک در مقایسه با گلیسرو فسفات سدیم، فنیل فسفات، دی گلوکوز فسفات بیشتر است، که این با نتایج مطالعه حاضر تناقض دارد. علت این تناقض شاید به دلیل نوع اسیدفیتیک است. اسیدفیتیک که فیترتین در تحقیق خود استفاده کرد یک اسید فیتیک خالص شده از دانه برنج با جرم مولکولی ۶۶۰/۴ و فرمول مولکولی $C_6H_6Na_2O_{24}P_6$ است. اما در تحقیق حاضر، اسید فیتیک که استفاده شد خالص شده از گیاه ذرت است که جرم مولکولی آن ۹۲۳/۸ و فرم مولکولی آن $C_6H_6Na_{12}O_{24}P_6$ می‌باشد. در این نوع اسید فیتیک، ۱۲ تا سدیم وجود دارد که ممکن است سبب شوری و بالارفتن EC در محیط کشت، مانع فعالیت بیشتر فسفاتاز اسیدی شود و یا در رشد قارچها تاثیر گذار باشد.

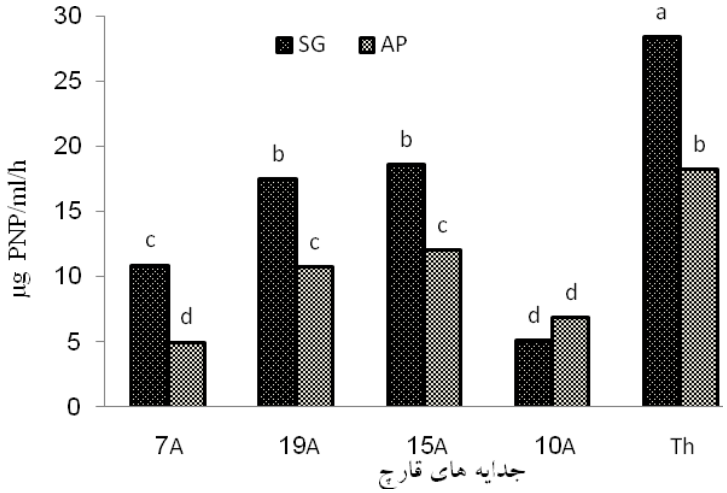
فعالیت فسفاتاز قلیایی جدایه‌های قارچ در دو محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم و اسید فیتیک ۱۴ روز پس از تلقیح، در شکل ۲ نشان داده شده است. در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم، بین اکثریت جدایه‌ها از لحاظ فسفاتاز قلیایی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در میان جدایه‌های آسپرژیلوس، A_{15} و A_{19} بیشترین وA_{10} کمترین و در بین کلیه جدایه‌ها Th بیشترین و A_{10} کمترین فعالیت فسفاتاز قلیایی را نشان دادند.



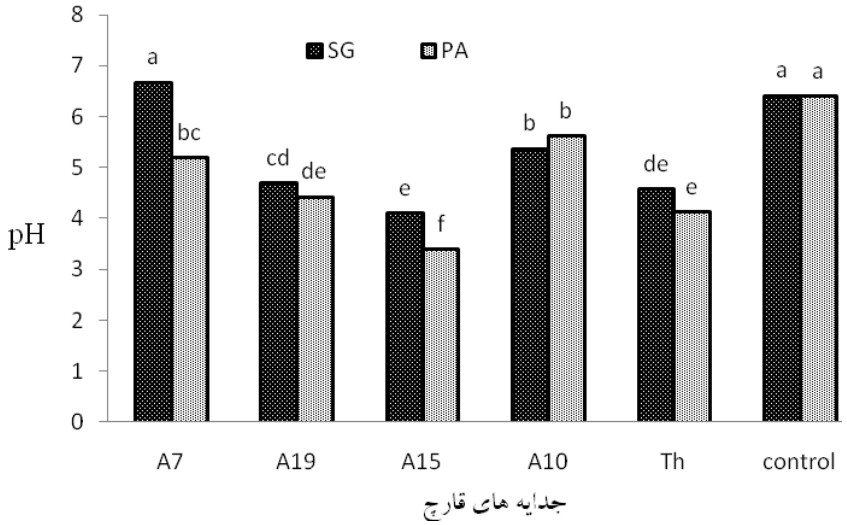
شکل ۱- تاثیر ترکیبات آلی فسفر و جدایه‌های قارچ بر فعالیت فسفاتاز اسیدی

در محیط حاوی اسید فیتیک، در میان جدایه‌های آسپرژیلوس A_{15} و A_{19} بیشترین وA_{10} و A_7 کمترین و در مقایسه کلی جدایه‌ها، Th بیشترین فعالیت فسفاتاز قلیایی را به همراه داشتند. آسری و همکاران (۵) طی مقایسه ای که بین گونه‌های، *Aspergillus*، *Penicillium*، *Pseudeurotium zonatum* و *Trichoderma sp* در رابطه با فعالیت فسفاتاز قلیایی انجام دادند، بیان کردند که قارچ *Trichoderma Sp* بیشترین فعالیت فسفاتاز قلیایی را دارد. در میان گونه‌های آسپرژیلوس بیشترین فعالیت مربوط به گونه *Aspergillus parasiticus* بود. همچنین در این شکل مشاهده می شود که فعالیت فسفاتاز قلیایی جدایه در محیط حاوی گلیسروفسفات سدیم بیشتر از محیط اسید فیتیک است. نوع ترکیب آلی بر فعالیت متابولیتی قارچها از جمله فسفاتاز قلیایی نیز تاثیر دارد (۸).

تغییرات pH محیط کشت‌های حاوی ترکیبات آلی در شکل ۳ نشان داده شده است، با گذشت ۱۴ روز پس از تلقیح ، در بیشتر جدایه‌ها نسبت به شاهد کاهش pH به نسبت‌های متفاوتی مشاهده می‌گردد. جدایه A_{15} در میان جدایه‌ها بیشترین افت pH را دارد. جدایه Th و A_{19} بعد از A_{15} بیشترین افت pH را داشتند و بین آن دو جدایه، اختلاف معنی داری از لحاظ آماری مشاهده نشد.



شکل ۲ - تاثیر ترکیبات آلی فسفر و جدایه‌های قارچ بر فعالیت فسفاتاز قلیایی



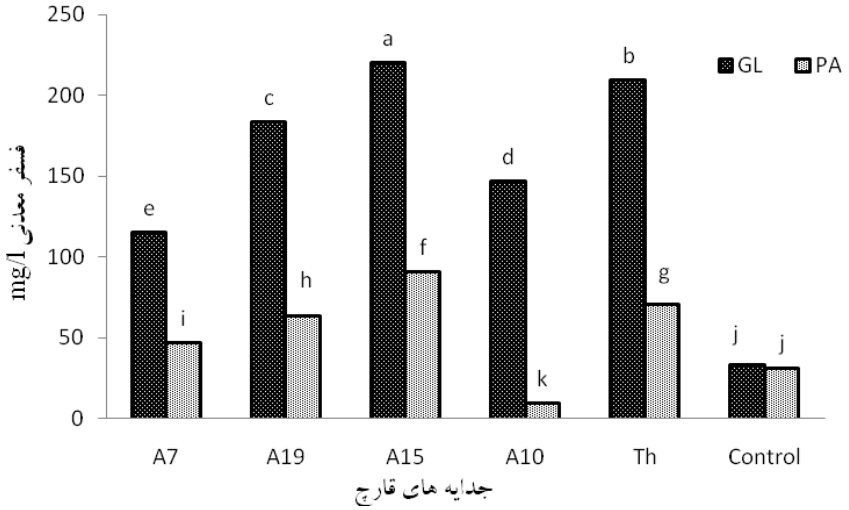
شکل ۳ - تاثیر ترکیبات آلی فسفر و جدایه‌های قارچ بر pH محیط کشت

در طی بررسی که آسری و همکاران (۵) بر pH جدایه‌های قارچ با گذشت زمان انجام دادند، دریافتند که جدایه‌های مختلف قارچی با گذشت زمان باعث اسیدی شدن محیط کشت می‌شوند، در این تحقیق قارچ *Trichoderma harzianum* در محیط کشت مایع زاپک بیشترین افت pH را داشت و *Penicillium simplicissimum* اسیدیته کمتری در محیط ایجاد کرده است. آسری بیان کرد که کاهش در pH محیط کشت که با زمان صورت گرفت بدلیل آزاد شدن اسیدهای آلی مختلف توسط قارچها از جمله مالات، اگزالات، سیترات، می‌باشد. در طی بررسی که توسط یاداو و طرفدار (۲۷) در همین زمینه صورت گرفت قارچ *Aspergillus niger* در میان قارچ-های بررسی شده سریعترین رشد را داشت و بیشترین کاهش pH محیط مایع را به همراه داشت. که این با یافته‌های مطالعه حاضر همانندی دارد.

تاثیر جدایه‌ها و نوع ترکیبات آلی بر هیدرولیز اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم در شکل ۴ نشان داده شده است. در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم، میزان فسفر معدنی در محیط کشت تمامی جدایه‌ها از تیمار شاهد بیشتر بود که این نشان دهنده توانایی بالای جدایه‌ها در هیدرولیز این ترکیب می‌باشد (تیمار شاهد که فاقد قارچ بود میزان فسفر معدنی اولیه را نشان می‌دهد). از طرفی اختلاف معنی داری بین کارایی جدایه‌ها در هیدرولیز این ترکیب آلی وجود داشت ($P <$ ۰/۰۵). بیشترین میزان فسفر معدنی در محیط کشت جدایه A_{15} (آسپرژیلوس نیجر) مشاهده شد و بعد از آن Th، A_{19}، A_{10} و A_7 به ترتیب توانایی در هیدرولیز گلیسرو فسفات سدیم را داشتند. در محیط حاوی اسید فیتیک تمامی جدایه‌ها به جز A_{10} توانایی هیدرولیز این ترکیب آلی را داشتند و میزان فسفر معدنی موجود در محیط رشدشان بیشتر از شاهد بود. در طی تحقیقی که توسط فیترتین و همکاران (۸) در رابطه با تاثیر منابع آلی فسفردار بر توانایی ریزجانداران حل کننده فسفات صورت گرفت، دریافتند که بیشترین فسفر معدنی در محیط کشتی که جدایه‌های *Aspergillus niger* و *Penicillum Sp* رشد کرده بودند، مشاهده شد. طی مطالعه دیگری که در رابطه با توانایی قارچهای مختلف از جمله گونه‌های آسپرژیلوس، تریکودرما، پنیسیلیوم در هیدرولیز ترکیبات آلی صورت گرفت، گزارش شد که بین جدایه‌های قارچها از لحاظ توانایی در هیدرولیز ترکیبات آلی فسفردار اختلاف معنی داری وجود دارد و در میان قارچها، قارچ *Trichoderma harzianum* بیشترین کارایی را در هیدرولیز گلیسرو فسفات سدیم و فیتین دارد. در این مطالعه اختلاف در میزان آزاد سازی آنزیم فسفاتاز توسط قارچها را دلیل متفاوت بودن کارایی قارچها در هیدرولیز ترکیبات آلی فسفردار بیان کردند (۵). در میان گونه‌های آسپرژیلوس، امرسیلا و پنیسیلیوم در طی پژوهشی دیگرآسپرژیلوس نیجر بیشترین توانایی را در هیدرولیز گلیسرو فسفات سدیم و اسید فیتیک داشت (۲۷). تفاوت جدایه‌های قارچ در میزان معدنی‌کردن ترکیبات آلی فسفردار، ممکن است به دلایل مختلفی باشد که از آن جمله می‌توان اختلافات ژنتیکی، اختلاف در تولید آنزیم‌های فسفاتاز و فیتاز، تفاوت در میزان رشد قارچها، تاثیرات متفاوت ترکیبات آلی فسفردار بر توانایی هرکدام از جدایه‌ها را نام برد، البته pH متفاوتی که هر کدام از جدایه‌ها در محیط کشت خود با گذشت زمان ایجاد می‌کنند نیز بر توانایی تولید آنزیم‌ها و همچنین کارایی جدایه‌ها جهت هیدرولیز ترکیبات آلی تاثیر می‌گذارد. بعضی از جدایه‌ها میزان فسفر معدنی آن‌ها از شاهد کمتر شده است شاید دلیل آن مصرف فسفر معدنی موجود در محیط توسط

جدایه‌ها می باشد، فسفر یکی از عناصر ضروری برای رشد قارچ می‌باشد که قارچ از فرم معدنی فسفر استفاده می‌کند. متابولیسم فسفر با عملیات تنفس و متابولیسم کربوهیدرات‌ها رابطه دارد و افزایش آن باعث استفاده بیشتر از کربوهیدرات‌ها می‌گردد (۳). در طی تحقیقات صورت گرفته توسط فیترتین و همکاران (۹) بر معدنی‌کردن اسید فیتیک توسط باکتری‌ها، مشاهده شدکه بعضی از جدایه‌ها میزان فسفر معدنی موجود در محیط کشتشان از میزان فسفر معدنی شاهد کمتر است. در بررسی دیگری که توسط همین محقق در این زمینه صورت گرفت رنج فسفر معدنی موجود درمحیط کشت قارچها و باکتری‌ها که حاوی بستره های آلی فسفردار بودند از ۱/۶۶ تا ۲۳۰/۹ میلی گرم در لیتر گزارش شده است (۸) که این با نتایج ما نیز همانندی داشت. در گزارش دیگری که در رابطه با حلالیت فسفات‌ها توسط قارچ‌ها صورت گرفته است در محیطی که حاوی نیترات پتاسیم به عنوان منبع نیتروژن بود، میزان فسفر معدنی جدایه آسپرژیلوس از میزان شاهد کمتر بود (۲۹). در رابطه با تاثیر نوع ترکیبات آلی (اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم) بر میزان فسفر معدنی شکل ۴ نشان می‌دهد که بین دو نوع ترکیب آلی فسفر از لحاظ توان معدنی‌شدن توسط جدایه‌ها اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < ۰/۰۵$). جدایه‌های قارچ در محیط کشت مایع حاوی گلیسرو فسفات سدیم، فسفر معدنی بیشتری را آزاد کردند. علت آن ممکن است مربوط به ساختار مولکولی دو نوع ترکیب آلی باشد. گلیسرو فسفات سدیم یک ترکیب آلی منو فسفاته است در حالیکه اسید فیتیک (فیتات سدیم) یک ترکیب آلی هگزا فسفاته و حلقوی می‌باشد که ۱۲ تا سدیم در اطراف آن وجود دارد. ممکن است جدا شدن فسفرها از ترکیب اسید فیتیک به مراتب کمتر و سخت‌تر از گلیسرو فسفات سدیم باشد، فسفرها با پیوند محکمتری به کربن‌ها متصل هستند، برای جداشدن، نیاز به آنزیم‌های بیشتری دارند. بیشتر جدایه‌ها در محیط کشت حاوی اسید فیتیک آنزیم‌های کمتری آزاد کردند بر عکس در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم آنزیم‌های فسفاتاز بیشتری آزاد شد (شکل ۱ و ۲). در طی تحقیقی مشاهده شد که میزان فسفر معدنی شده توسط قارچها و باکتری‌ها در محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم بیشتر از ترکیبات منو فسفاته آلی از جمله دی گلوکوز منو فسفات و فنیل فسفات و ترکیب هگزا فسفاته (اسید فیتیک) می‌باشد (۸). همچنین نتایج بیان شده با تحقیقات یاداو و طرفدار نیز همخوانی داشت که بیان کردند که نوع بستره آلی بر میزان آزاد شدن فسفر معدنی در نتیجه هیدرولیز توسط قارچها اثر دارد، فسفر معدنی شده از ترکیب گلیسروفسفات سدیم بیشتر از اسید فیتیک است (۲۷).

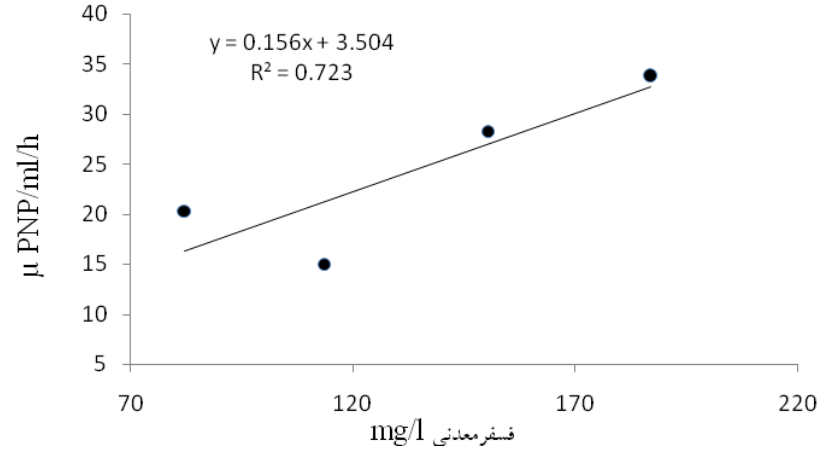
همانطوریکه در شکل ۵ مشاهده می‌شود، بین فعالیت فسفاتاز اسیدی و فسفر معدنی موجود در محیط رشد آسپرژیلوس‌ها که حاوی گلیسرو فسفات سدیم بودند، همبستگی مثبتی وجود دارد. با افزایش فعالیت فسفاتاز اسیدی، توانایی قارچها جهت هیدرولیز گلیسرو فسفات سدیم افزایش می‌یابد و فسفر معدنی بیشتری آزاد می‌شود. جدایه A_{15}، فعالیت فسفاتاز اسیدی بیشتری در میان جدایه‌های آسپرژیلوس داشت (شکل ۱) و میزان فسفر معدنی موجود در محیط آن نیز از بقیه آسپرژیلوس‌ها بیشتر بود (شکل ۴). بین جدایه A_{15} و Th، جدایه A_{15} میزان فعالیت فسفاتازاسیدی کمتری نسبت به تریکودرما (Th)در دو محیط نشان داد (شکل ۱) اما میزان فسفر معدنی در محیط کشت آن از جدایه تریکودرما بیشتر بود (شکل ۴) شاید دلیل آن به خاطر شرایط اسیدی‌تری است که در محیط جدایه A_{15} نسبت به تریکودرما (Th) وجود دارد (شکل ۳) که سبب توانایی بیشتر این جدایه جهت هیدرولیز فسفات‌های آلی شده است.



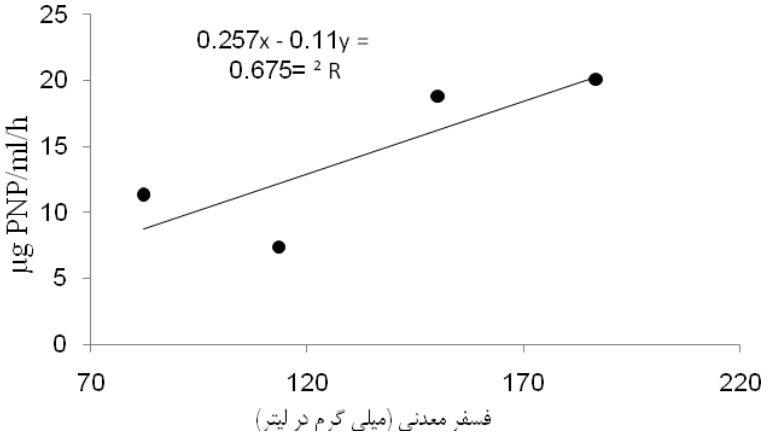
شکل ٤ - تاثیر ترکیبات آلی فسفر و جدایه‌های قارچ بر میزان فسفر معدنی

نتایج تحقیقات باریک و همکاران (۶) حاکی از این بود که همبستگی مثبتی بین میزان حلالیت فسفر و فعالیت فسفاتاز وجود دارد، این ممکن است به‌دلیل قابلیت دسترسی بیشتر فسفر در محیط کشت باشد. همچنین فیترتین و همکاران (۸)، بیان کردند که بین فعالیت فسفاتاز و فسفر قابل حل رابطه مثبتی وجود دارد و جدایه‌ای که فعالیت فسفاتاز بالاتری دارد فسفر قابل حل بیشتری تولید می‌کند. این تحقیق با نتیجه ساکورا و همکاران (۲۱) نیز همخوانی داشت که رابطه مثبتی را بین فعالیت فسفاتاز و فسفر قابل حل گزارش کردند. همچنین در طی تحقیقی که بر روی باکتری‌ها در این زمینه صورت گرفت نیز همبستگی مثبتی بین توانایی حلالیت فسفات و فعالیت فسفاتاز وجود داشت، سویه GPO2 که بیشترین فسفر را در محیط فراهم کرد فعالیت آنزیمی آن نیز بیشتر بود و به دنبال آن سویه SPO3 بود (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر که بر قابلیت دسترسی فسفر توسط قارچ‌های آسپرژیلوس، تریکودرما و پنیسیلیوم از منابع آلی صورت گرفت، بیان شد که بین آنزیم‌ها یا پروتیین‌های خارج سلولی و میزان فسفری که معدنی شده بود همبستگی وجود داشت در حالیکه با بیومس رابطه ای نداشت. در واقع افزایش فسفر در محیط کشت ترشح پروتئین‌های خارج سلولی را افزایش داده است (۱۶).

در شکل ۶ ، نیز بین فعالیت فسفاتاز قلیایی و فسفر معدنی موجود در محیط رشد جدایه‌های آسپرژیلوس، ۱۴روز پس از تلقیح، رابطه مثبتی وجود دارد. با توجه به شکل‌های ۵ و ۶ با افزایش فعالیت فسفاتاز جدایه‌های آسپرژیلوس میزان معدنی شدن فسفر آلی گلیسرو فسفات سدیم افزایش می‌یابد. بین دو آنزیم فسفاتاز، میزان R^2 اسیدی بیشتر از قلیایی است.



شکل ۵ - رابطه فسفاتاز اسیدی و فسفر معدنی در محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم



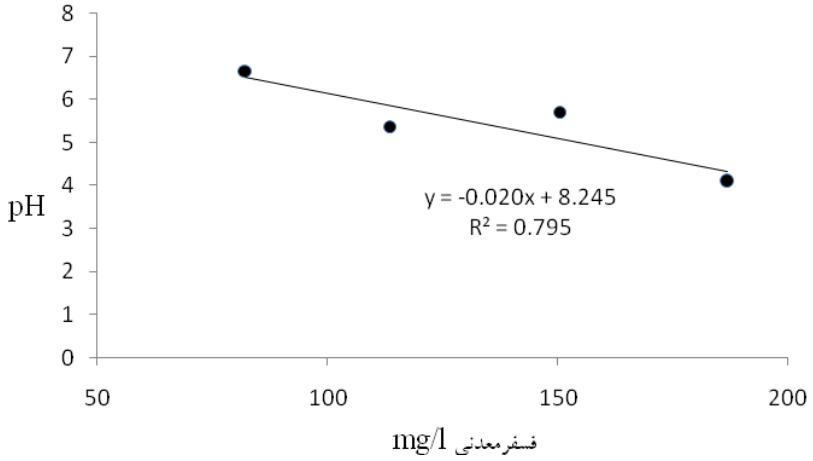
شکل ٦ - رابطه فسفاتاز قلیایی و فسفر معدنی محیط کشت گلیسرو فسفات سدیم

به نظر می‌رسد که همبستگی بیشتری بین فسفاتاز اسیدی و معدنی شدن فسفر آلی نسبت به فسفاتاز قلیایی وجود دارد، از طرفی فسفاتاز اسیدی توسط جدایه‌ها بیشتر از قلیایی در محیط آزاد شده است پس ممکن است تاثیر فسفاتاز اسیدی بیشتر از قلیایی بوده است.

همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود بین تغییرات pH و فسفر معدنی موجود در محیط رشد آسپرژیلوس‌ها که حاوی گلیسروفسفات سدیم بودند، همبستگی معکوسی وجود دارد. با کاهش pH محیط رشد آسپرژیلوس‌ها میزان معدنی شدن فسفر آلی این ترکیب افزایش می‌یابد. کمترین pH مربوط به جدایه A_{15} می‌باشد (شکل ۳) و از طرفی بیشترین میزان فسفر معدنی در محیط کشت مایع همین جدایه مشاهده شده است (شکل ۴). در تحقیق یاداو و طرفدار (۲۷) بیان شد که قارچ‌های مختلف توانایی‌های متفاوتی جهت هیدرولیز ترکیبات آلی مثل فیتین و گلیسرو فسفات سدیم دارند. از طرفی علاوه بر اینکه شکستن پیوندهای C–O–P توسط آنزیم‌های فسفاتاز و فیتاز میکروبی صورت می‌گیرد، ریزجانداران اسیدهای آلی مختلفی تولید می‌کنند، که در آزاد شدن بیشتر فسفر معدنی موثر می‌باشند. در این تحقیق آسپرژیلوس نیجر بیشترین افت pH را داشت و میزان معدنی شدن فسفر نیز در محیط کشت این گونه قارچی از بقیه جدایه‌ها بیشتر بود. همچنین نتایج تحقیقات آسری و همکارانش (۵) حاکی از این بود که تغییرات در pH یک معیار مهمی در معدنی شدن فسفر از ترکیبات آلی می‌باشد. طرفدار و جانک (۲۵) بیان کردند که ترشح همزمان اسیدهای آلی و آنزیم فسفاتاز سبب افزایش انحلال فسفر می‌شود، در واقع آزاد شدن فسفرهای آلی پیوند خورده و معدنی شدن آنها از طریق افزایش میزان آبکافت صورت می‌گیرد.

نتیجه گیری

این پژوهش نشان داد که قارچ‌های مختلف از لحاظ توانایی در هیدرولیز اسید فیتیک وگلیسروفسفات سدیم متفاوت بودند. حتی گونه‌های آسپرژیلوس نیز از این نظر با هم اختلاف داشتند. گلیسرو فسفات سدیم بیشتر از اسیدفیتیک تحت عمل هیدرولیز قارچها قرار گرفت. آسپرژیلوس نیجر (A_{15}) بیشترین توانایی را در معدنی کردن ترکیبات آلی فسفر داشت. در میان جدایه‌های آسپرژیلوس، بیشترین فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی و همچنین بیشترین کاهش pH در محیط حاوی دو نوع ترکیب آلی، توسط جدایه A_{15} رخ داد. این تحقیق نشان داد که بین میزان فسفر معدنی موجود در محیط کشت جدایه‌های آسپرژیلوس و فسفاتاز همبستگی مثبت و با عامل pH محیط همبستگی منفی و معکوس وجود دارد. به نظر می‌رسد که عامل pH محیط نسبت به آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی با معدنی کردن فسفر آلی همبستگی بیشتری را نشان می‌دهد.



شکل ۷- رابطه بین pH و فسفرمعدنی در محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم

منابع

۱- سالاردینی ع.ا. ۱۳۷۴. حاصلخیزی خاک. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه ۴۴۱.

۲- صالح راستین ن. ۱۳۷۷. کودهای بیولوژیک. نشریه علمی پژوهشی خاک و آب تهران ۱۲ (۳): ۱ تا ۳۶.

۳- مهرآوران ح. ۱۳۷۲. مبانی قارچها. انتشارات دانشگاه ارومیه. صفحه ۵۳۱.

4- Aleksieva P., Spasova D., and Radoerska S. 2003. Acid Phosphatase Distribution and Localization in the Fungus

Humicola lutea, Zeitschrift fur Naturforschung C (Journal of Biosciences), 58(3/4):239-243.
5- Aseri G.K., Neelam J., and Tarafdar J.C. 2009. Hydrolysis of Organic Phosphate Forms by phosphatases and Phytase Producing Fungi of Arid and Semi Arid Soils of India, American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science, 5(4):564-570.
6- Barik S.K., Purushothaman C.S., and Mohanty A.N. 2001. Phosphatase activity with reference to bacteria and phosphorus in tropical freshwater aquaculture pond systems, Aquaculture Research, 32:819-832.
7- Chabot R., Antoun H., and Cescas M.P. 1993. Microbiological solubilization of inorganic P-fractions normally encountered in soils. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements ,77:329 P
8- Fitriatin B.N., Subroto T., and Joy B. 2008. The Influence of Organic Phosphorous Substrate on Phosphatase Activity of Soil Microbes, Proceeding of the International Seminar on Chemistry ,October 30- 31,663 p.
9- Fitriatin B.N., Arief D.H., Simarmata T., Santosa D.A., and Joy B. 2011. Phosphatase-producing bacteria isolated from Sanggabuana Forest and their capability to hydrolyze organic phosphate, Journal of Soil Science and Environmental Management, 2(10):299-303.
10- George T.S., Gregory P.J., Wood M., Read D., and Buresh R.J. 2002. Phosphatase activity and organic acids in the rhizosphere of potential agroforestry species and maize, Soil Biology and Biochemistry ,34:1487-1494.
11- Hubel F., Beck E. 1993. In situ determination of the P-relation around the primary root of maize with respect to inorganic and phytase, Plant and Soil, 157:1-9.
12- Kucey R.M.N. 1983. Phosphate,solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils, Journal Soil Science, 63:671–678.
13- Kucey R.M.N., Janzen H.H., and Leggett M.E. 1989. Microbiologically mediated increases in plant-available phosphorus, Advances in Agronomy, 42:199-228.
14- Megazyme International Ireland limited. 2007. Phytic acid (Phytate)/ total phosphorus. Measured as phosphorus released by phytase and alkaline phosphatase.
15- McLaughlin M.J., Baker T.G., James T.R., and Rundle J.A. 1990. Distribution and forms of phosphorus and aluminum in acidic topsoils under pastures in south, eastern Australia, Australian Journal of Soil Research ,28(3):371-385.
16- Omar S.A. 1998. Availability of phosphorus and sulfur of insecticide origin by fungi, Biodegradation journal ,9(5): 327-336.
17- Ponmurugan P. and Gopi C. 2006. In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria, African Journal of Biotechnology ,5:348- 350.
18- Rao A.V., and Tarafdar J.C. 2002. Microbial mobilizatrion of phosphorous for higher crop production in arid soils, in Biotechnology of Biofertilizers, Kannaiyan S. India.
19- Sarapatka N. 2003. Phosphatase activities (ACP-ALP) in Agro ecosystem Soils, Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences .
20- Sanyal S.K., and Datta S.K. 1991. Chemistry of phosphorus transformation in soil, Advances in Soil Science, 16:1-20.
21- Sakurai M., Wasaki J., Tomizawa Y., Shinano T., and Osaki M. 2008. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter, Soil. Science Plant Nutrition ,54:62-71.
22- Tabatabai M.A., and Bremner J.M. 1969. Use of P-nitro phenyl phosphate for assay of phosphatase Fertility of Soils, Soil Biology and Biochemistry ,1:301-307.
23- Tarafdar J.C., Yadav R.S. and Meena S.C. 2001. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources, Plant nutrition and Soil Science ,164:279-282.
24- Tarafdar J.C. and Marschner H. 1995. Dual inoculation with Aspergillus fumigatus and Glomus mosseae enhances biomass production and nutrient uptake in wheat (*Triticum aestivum*) supplied with organic phosphorus as Na-phytate, Plant and Soil, 173:97-102.
25- Tarafdar J.C. and Jungk A. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus, Biology and Fertility of Soils,3:199-204.
26- Turner B.L., Frossard E. and Baldwin D.S. 2005. Organic Phosphorus in the Environment, CABI Publishing Series ,412 P,
27- Yadav R.S. and Tarafdar J.C. 2003. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds, Soil Biology and Biochemistry ,35:745-751.
28- Yadav B.K. and Tarafdar J.C. 2011. Penicillium purpurogenum, Unique P Mobilizers in Arid Agro- Ecosystems, Arid Land Research and Management ,25:87–99.
29- Zhenlun Li., Zhongkang W., Guoxiong P., Youping Y., Hua Z., Yueqing C. and Yuxian X. 2007. Regulation of extracellular acid phosphatase biosynthesis by culture conditions in entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae strain CQMa102, Biomedical and Life Sciences ,57:565-570.

Journal of Water and Soil
Vol. 27, No. 6, Jan.-Feb. 2014, p. 1090-1099

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۶، بهمن - اسفند ۱۳۹۲، ص. ۱۰۹۹-۱۰۹۰

The Effect of Aspergillus Isolates on Hydrolysis of Soil Organic Phosphorus (Phytic Acid and Sodium Glycerophosphate)

T. Javaheri[1]*- A. Lakzian[2]- P. Taheri[3]- R. Khorasani[4]
Received:28-10-2012
Accepted:25-08-2013

Abstract

Organic phosphorus is the dominant part of soil phosphorus. Phytic acid and sodium Glycerophosphate are two different forms of soil organic phosphorus. Soil fungi play an important role in the conversion of these compounds into inorganic forms. Among the fungi, Aspergillus is one of the most effective organisms in hydrolysis of organic compounds. In order to study the ability of Aspergillus fungi on the hydrolysis of Phytic acid and sodium Glycerophosphate, an experiment was conducted as a completely randomized design with factorial arrangement and three replications. The first experimental factor include five fungi isolates (four Aspergillus isolates, *Trichoderma harzianum* and control) and the second factor include two different organic phosphorus compounds (Phytic acid and Sodium Glycerophosphate). All isolated were grown in PDB at 28 ^{o}C and rate of hydrolysis of inorganic phosphorus was determined after 14 days inoculation. In addition, acid and alkaline phosphatase activity and medium pH were measured. The results showed that Aspergillus isolates and *Trichoderma harzianum* mineralized organic phosphorus significantly ($p<0/05$). Among the studied isolates, the highest level of inorganic phosphorus was observed in *Aspergillus niger* (A_{15}) treatment. The results also showed that the type of organic phosphorus compound had a significant effect on hydrolysis of organic phosphorus. The mineralization of Glycerophosphate was higher than Phytic Acid. Acid and alkaline phosphatase activity in Sodium Glycerophosphate treatment was higher than Phytic Acid after 14 days inoculation but the pH of medium containing Phytic acid decreased more than Sodium Glycerophosphate . Mineralization of organic phosphorus had a positive and negative relationship with phosphatase activity and medium pH respectively.

Keywords: Inorganic phosphorus, Hydrolysis, Aspergillus, Phytic Acid, Sodium Glycerophosphate

1,2,4- M.S.c Student, Professor and Assistant Professor of Soil Science Department, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively
(*- Corresponding Author Email: niko5934@yahoo.com)
3- Assistant Professor of Plant Protection Department, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad