بررسی فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌های مختلف قارچ‌های خاکزی در حضور ترکیبات آلی فسفره (اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم)

تکتم جواهری[1]، امیر لکزیان، رضا خراسانی و پریسا طاهری

دانشجوی کارشناسی ارشدگروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ niko5934@yahoo.com

استاد علوم خاک، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ alakzian@yahoo.com

استادیار علوم خاک، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ Khorasani@um.ac.ir

استادیار گیاهپزشکی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ P-taheri@ferdowsi.um.ac.ir

دریافت: 92/6/23 و پذیرش: 93/5/14

چکیده

قارچ‌های خاکزی در چرخه عناصر غذایی اهمیت زیادی دارند. بسیاری از آن‌ها در تبدیل مواد آلی به فرم معدنی با تولید آنزیم‌های مختلف نقش مهمی دارند. از آنجائی که بخش عمده فسفر خاک در خاک‌های آلی به فرم آلی می‌باشد نقش قارچ‌ها در معدنی کردن این ترکیبات بسیار با اهمیت است. به منظور مطالعه تأثیر بستره‌های اسید فیتیک و گلیسروفسفات سدیم بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌های قارچی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی بصورت فاکتوریل و در سه تکرار انجام شد. نخستین فاکتور آزمایش شامل 7 جدایه قارچی (4 جدایه قارچ *Aspergillus* spp. (A_7، A_{10}، A_{15}، A_{19}) و 3 جدایه از قارچ‌های (*Trichoderma harzianum* (Th)، *Rhizoctonia solani* (R) و *Penicillium* spp. (P)) به همراه تیمار شاهد (فاقد قارچ) و دومین فاکتور، ترکیبات آلی فسفردار (اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم) بودند. فعالیت فسفاتازهای اسیدی و قلیایی خارج سلولی ترشح شده توسط جدایه‌های فوق که در محیط کشت PDB در دمای 28 درجه سانتیگراد رشد داده شده بودند طی دو زمان 7 و 14 روز اندازه-گیری شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که کلیه جدایه‌های قارچی در میزان فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی در سطح 5 درصد اختلاف معنی‌داری داشتند و از میان جدایه‌ها، بیشترین فعالیت فسفاتاز قلیایی و اسیدی مربوط به قارچ *Trichoderma harzianum* بود. در این آزمایش جدایه A_{15} در بین جدایه‌های *آسپرژیلوس* بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان داد. بررسی‌ها حاکی از این بود که فعالیت فسفاتاز اسیدی در کلیه جدایه‌ها از فسفاتاز قلیایی بیشتر می‌باشد و نوع فسفر آلی بر فعالیت فسفاتاز در بین کلیه جدایه‌های مورد مطالعه تأثیر معنی‌داری داشته است. فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی در محیط کشت گلیسرو فسفات سدیم بیشتر ازمحیط کشت اسید فیتیک بود.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های خاکزی، اسید فیتیک، گلیسرو فسفات سدیم، فسفاتاز اسیدی و قلیایی

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بسیاری از ریزجانداران آزادزی در خاک هستند که توانایی تولید آنزیم‌های برون سلولی و درون سلولی مانند فسفاتاز و فیتاز را دارند (هابل و بیک،1993). فسفاتاز آنزیمی است که از طریق هیدرولیز کردن مواسترهای اسیدفسفریک و تبدیل آن‌ها به یون فسفات و مولکولی با یک گروه هیدروکسیل آزاد، گروه فسفات را از پیش ماده (بستره) خود جدا می‌سازد. این آنزیم‌ها بستره های مختلفی دارند که از لحاظ ساختمانی با هم فرق دارند. فسفاتازها در چرخه بیوژئوشیمی فسفر نقش مهمی ایفا می‌کنند(گوماریس و همکاران، 2006). کارکرد این آنزیم‌ها برعکس آنزیم‌های کیناز و فسفوریلاز است. آنزیم‌های کیناز و فسفوریلاز گروه‌های فسفات را با استفاده از مولکول‌های پر انرژی مثل ATP به پیش ماده خود متصل می‌سازند (گوماریس و همکاران، 2006).

فسفاتازهای درون سلولی که در واکوئل و وزیکول قرار دارند بعد از تخریب غشای سلولی آزاد می‌شوند و به خارج سلول راه می‌یابند، این آنزیم‌های خارج سلولی روی دیواره سلولی ریشه‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌های گرم مثبت جذب می‌شوند (آسری و همکاران، 2009). ترشح این آنزیم‌ها در خاک توسط گیاهان و جانوران نیز صورت می‌گیرد. اگرچه ریشه‌های گیاه در تولید فسفاتازها نقش دارند اما فسفاتازهای میکروبی (قارچ‌ها و باکتری‌ها) در هیدرولیز ترکیبات آلی خاک مؤثرترهستند (طرفدار و جانک، 1987). قارچ‌های حل کننده فسفات نسبت به باکتری‌ها برای آزادکردن آنزیم‌های فسفاتاز در خاک و حل کردن فسفر خاک برتری دارند، زیرا ریسه‌های آن‌ها می‌توانند فواصل دورتری از خاک را به آسانی در مقایسه با باکتری‌ها طی کنند (کوسی، 1983). آنزیم‌های زیادی توسط قارچ‌ها تولید می‌شوند که در چرخه عناصر غذایی خاک نقش مهمی ایفا می‌کنند.

علاوه بر آن در صنعت‌های مختلف کاربردهای بیوتکنولوژی فراوانی دارند. در میان تعداد زیادی از ریز جانداران غیر پاتوژن، قارچ‌های *فیلامنتوس* بدلیل کشت آسان، تولید بالای آنزیم‌های خارج سلولی، بسیار مورد توجه قرار می‌گیرند (گوماریس و همکاران، 2006). *آسپرژیلوس* از جمله قارچ‌های حل کننده فسفات در ریزوسفر است که توانایی معدنی کردن فسفرآلی به معدنی را از طریق فرایند هیدرولیز دارد (فیترتین و همکاران، 2008). میزان معدنی شدن فسفر بستگی به فعالیت میکروبی و فعالیت فسفاتازها دارد (ساپاراتکا، 2003). چندین نوع فسفاتاز در خاک وجود دارد و آن‌هایی که بیشتر معمول‌اند شامل فسفومنواسترازها و فسفودی استرازها و فیتازها هستند. فسفومنواسترازها بر روی منواسترهای فسفات عمل می‌کنند و بر اساس اپتیمم pH محیط به دو صورت فسفومنواسترازهای اسیدی و قلیایی تقسیم می‌شوند. فسفومنواسترازهای اسیدی در خاک‌های اسیدی و فسفومنواسترازهای قلیایی در خاک‌های بازی و خنثی بیشترین فعالیت را دارند (ساپاراتکا، 2003). فیلیپ و همکاران (2008) گزارش کردند که پروسه معدنی شدن فسفر از ترکیبات فسفر آلی توسط آنزیم‌ها بخصوص فسفاتاز و فیتاز صورت می‌گیرد، این مکانیزم‌ها در مدیریت حاصلخیزی خاک و تغذیه گیاه نقش مهمی دارند. اینوزیتول پنتا - هگزا فسفات‌ها (فیتات) و مشتقات آن (فیتات کلسیم و منیزیم‌دار) و همچنین گلیسرو فسفات سدیم از جمله ترکیبات فسفر آلی خاک محسوب می‌شوند (تورنر و همکاران، 2005).

اینوزیتول فسفات‌ها (منو و هگزا فسفات) یا فیتات (IP6) در طبیعت فراوان یافت شده و بخش عظیمی از اینوزیتول فسفات سلول‌های یوکاریوت را شامل می‌شوند. اسید فیتیک یا فیتات، فرم ذخیره‌ای ابتدایی فسفر در دانه‌های گیاهان می‌باشد (برینچ پدرسین و همکاران، 2002؛ واتس و بانرجی، 2004) و مرتبط به بخش فیبری بعضی از غذاها مانند سبوس و غلات است (هاروس و همکاران، 2005). در علوفه‌ها یک سوم فسفر به صورت فسفر معدنی قابل هضم و دو سوم به صورت فسفر آلی به شکل فیتین می‌باشند که با نمک‌های کلسیم و منیزیم مخلوط شده و به نام اسید اینوزیتول هگزا فسفریک یا همان اسید فیتیک معروف است (واتس و بانرجی، 2004). فیتاتها، بیش از 60 درصد فسفر آلی خاک‌ها را تشکیل می‌دهند و اغلب به صورت نمک‌هایی با یون‌های مختلف حضور دارند (جنینگ، 1995).

این ترکیب علاوه بر گیاه در حیوانات و حتی ریزجانداران نیز یافت می‌شوند (ریچاردز، 1987). گلیسرو فسفات سدیم یک ترکیب منو فسفاته آلی است و در خاک نیز وجود دارد و از گلیسرول و یک گروه فسفات تشکیل شده است این ترکیب در آب قابل حل است. نتایج تحقیقات تسکووا و همکاران (2002) نشان داد که بیشترین میزان تولید فسفاتاز اسیدی در طول فاز رشد تصاعدی و کمترین میزان تولید این آنزیم در فاز ثابت رشد قارچ روی می‌دهد. اما پاپاجیانی و همکاران (1999) نظری مخالف آن دادند که بیشترین میزان تولید فسفاتاز اسیدی در فاز ثابت قارچ رخ می‌دهد. در این رابطه الکسیوا و همکاران (2003) اشاره کردند که شیمی سلولی فسفاتاز وابسته به فسفر معدنی موجود در محیط است. نتایج بدست آمده از مطالعات یان هان و دانیل (2006)

Archive of SID

www.SID.ir

نشان داد که قارچ *Aspergillus Ficcum* آنزیم فسفاتاز بیشتری نسبت به آنزیم فیتاز در مجاورت فیتین تولید می کند.

در طی تحقیقات صورت گرفته در رابطه با دو نوع آنزیم فیتاز و فسفاتاز حاصل از یک نوع کپک به نام *Aspergillus Oryzae* نتایج نشان داد که سه نوع فسفاتاز اسیدی (ACP-I، ACP-II، ACP-III) در محیط کشت مایع قارچ فوق که حاوی اسید فیتیک (به عنوان تنها منبع فسفر) می‌باشد، مشاهده شده است. آنالیز این آنزیم‌ها نشان داد که ACP-I و ACP-III اسید فسفاتاز هستند و ACP-IIیک فیتاز می‌باشد. همچنین این آنزیم‌ها طی دوره های مختلف رشد میسیلیوم‌ها تولید شدند. آزاد شدن فسفر از اسید فیتیک به دلیل همکاری این سه آنزیم در هیدرولیز می‌باشند (فوجیتا و همکاران، 2002). در رابطه با قارچ *Emmericella rugulosa* یاداو و طرفدار (2003)، عنوان کردند که این قارچ باعث افزایش تولید و عملکرد گیاه ارزن می‌شود، دلیل آن را فراهم شدن فسفر از طریق فعالیت فسفاتاز و فیتاز عنوان کردند. واتس و بانرجی (2004)، گزارش کردند که تولید فسفاتاز هم در محیط کشت جامد و هم در محیط کشت مایع صورت می‌گیرد.

همچنین این محققین یکی از کاربردهای این آنزیم را اینطور بیان کردند که با اضافه کردن فسفاتاز اسیدی به جیره غذایی حیوانات تک معده‌ای می‌توان فسفر موجود در فیتات که در دانه‌های گیاهان موجود است را قابل حل کرد و به این ترتیب قابلیت دسترسی فسفر را در حیوان بهبود داد و از طرفی دفع فسفر به محیط را کاهش داد. آنزیم‌های فسفاتاز کاربرد صنعتی محدودی دارند اما فیتاز که یک نوع اسید فسفاتاز (EC.3.1.3.8) است، در خوراک دام بسیار حائز اهمیت می‌باشد (گوماریس و همکاران، 2006). بر پایه آنچه که از پژوهش‌های گوناگون بر می‌آید، فعالیت فسفاتازها در محیط کشت قارچ‌ها که حاوی ترکیبات آلی فسفره بودند بیشتر از سایر ریز جانداران می‌باشد. طبق تحقیقات صورت گرفته، *آسپرژیلوس‌ها* در این رابطه بسیار حائز اهمیت هستند. بر این اساس، هدف این پژوهش بررسی فعالیت فسفاتازهای اسیدی و قلیایی جدایه‌های آسپرژیلوس استان خراسان رضوی و مقایسه با سه جدایه *پنیسیلیوم و رایزوکتونیا سولانی و تریکودرما هارزیانوم* در حضور اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش‌ها

جهت مطالعه فعالیت فسفاتازهای اسیدی و قلیایی جدایه‌های قارچ، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی بصورت فاکتوریل و در سه تکرار انجام گرفت. نخستین فاکتور آزمایش، شامل هفت جدایه قارچی (چهار جدایه قارچ *Aspergillus* spp. (A_7، A_{10}، A_{15}، A_{19}) و سه جدایه از قارچ‌های *Trichoderma harzianum* (Th)، *Rhizoctonia solani* (R) و *Penicillium* spp. (P)) به همراه تیمار شاهد (فاقد قارچ) بودند. جدایه‌های *آسپرژیلوس* از خاک‌های مزارع مختلف استان خراسان (مشهد، قوچان، فریمان و بجنورد)، به روش رقیق سازی با پلیت جداسازی (آسری و همکاران، 2009) و پس از مشاهده در زیر میکروسکوپ شناسایی شدند. سه نوع قارچ *Rhizoctonia solani*،*Trichoderma harzianum* و.*Penicillium* spp از کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. دومین فاکتور ترکیبات آلی فسفره (اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم) بودند. گلیسرو فسفات سدیم به میزان 1/55 گرم در لیتر و فیتات سدیم (خالص شده از گیاه ذرت است، جرم مولکولی آن923/8 و فرم مولکولی آن $C_6H_6Na_{12}O_{24}P_6$می‌باشد) به میزان 0/77 گرم در لیتر بعد از استریل شدن محیط کشت مایع هر کدام 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 [1] به مدت 5 روز رشد داده شدند و سپس دیسک‌هایی با قطر 8 میلی‌متری برای تلقیح به 50 میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB [2] که حاوی ترکیبات آلی فسفر بودند، استفاده شد. ظروف حاوی محیط کشت مایع به همراه قارچ‌ها داخل انکوباتور در دمای 28 تا 30 درجه سانتیگراد قرار داده شدند (آسری و همکاران، 2009). در روز هفتم و چهاردهم پس از تلقیح، فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی خارج سلولی قارچ ها اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری آنزیم فسفاتاز از روش (طباطبایی و بریمنر،1969) استفاده شد. 1 میلی‌لیتر عصاره محیط کشت مایع را برداشته و به آن 4 میلی لیتر MUB (بافر اسیدی با pH= 6/5 جهت اندازه‌گیری فسفاتاز اسیدی و بافر قلیایی با pH= 10/5 جهت اندازه‌گیری فسفاتاز قلیایی) و 1میلی لیتر محلول پارانیتروفنیل فسفات

[1]. Potato Dextrose Agar
[2]. Potato Dextrose Broth

Archive of SID

www.SID.ir

اضافه شد. سپس ظروف حاوی این مواد در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 1 ساعت قرار گرفتند. بعد از یک ساعت به محلول فوق 1 میلی‌لیتر محلول کلرید کلسیم نیم مولار و 4 میلی‌لیتر 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 410 نانومتر، فعالیت فسفاتاز اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس توانایی که یک آنزیم برای آزاد کردن یک میکروگرم پارانیتروفنل در یک ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد دارد، تعریف می‌شود. میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز از طریق منحنی استاندارد تعیین شد. داده‌های به دست آمده در پایان آزمایش با کمک نرم افزارهای MSTATC و Excel مورد تجزیه و تحلیل‌های آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام شد.

نتایج و بحث

فعالیت فسفاتاز اسیدی جدایه‌های قارچ در دو محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم و اسید فیتیک، در شکل 1 نشان داده شده است. در این شکل گلیسروفسفات سدیم به صورت SG و اسیدفیتیک به صورت PA نمایش داده شده است. در محور x ها جدایه‌های قارچی هر کدام به صورت علامت اختصاری مشخص شده‌اند، *آسپرژیلوس*‌ها به ترتیب (A_7، A_{10}، A_{15}، A_{19}) ، (Th) *Trichoderma harzianum* ، *Rhizoctonia solani* (R) و *Penicillium* spp. (P) نمایش داده شده‌اند.

در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم، بین اکثریت جدایه‌ها از لحاظ فسفاتاز اسیدی اختلاف معنی داری مشاهده شد ($P<0/05$). در میان جدایه‌های *آسپرژیلوس*، A_{15} بیشترین و A_{10} کمترین و در مقایسه کلی بین جدایه‌ها، Th[1] بیشترین و A_{10} کمترین فعالیت فسفاتاز اسیدی را به همراه داشتند. در محیط حاوی اسید فیتیک، در میان قارچ‌های *آسپرژیلوس*، A_{15} و A_{19} بیشترین و A_{10} و A_7 کمترین و در مقایسه کلی، Th بیشترین فعالیت فسفاتاز اسیدی را نشان دادند. فعالیت فسفاتاز اسیدی در تیمار شاهد (بدون قارچ) بسیار کم (نزدیک به صفر) بود که از آن صرفنظر شد. آسری و همکاران (2009) 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 معنی‌داری وجود دارد، قارچ *Trichoderma harzianum*، 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. الکسیوا و همکاران (2002) 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 (مهرآوران، 1372). یکی دیگر از عواملی که سبب تغییر فعالیت آنزیمی بیشتر جدایه‌ها شده است ممکن است به علت این باشد که جدایه‌ها از لحاظ تولید میزان اسیدهای آلی متفاوتند در نتیجه در محیط آن ها pH متفاوتی ایجاد می‌شود که خود این عامل نیز بر فعالیت فسفاتاز آن‌ها تأثیر گذاشته و سبب اختلاف در این زمینه می‌شود. همانطور که در شکل 1 مشاهده می‌شود، در رابطه با تأثیر نوع ترکیب آلی بر فعالیت فسفاتاز اسیدی، جدایه‌ها در محیط گلیسرو فسفات سدیم نسبت به اسید فیتیک فعالیت فسفاتاز اسیدی بیشتری داشتند، به غیر از جدایه A_{10} و R^2 که اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت فسفاتاز اسیدی در دو محیط کشت حاوی دو بستره آلی نشان ندادند. نوع و غلظت بستره آلی از عواملی است که بر خصوصیات متابولیکی ریزجانداران اثر دارد و باعث ایجاد اختلاف در فعالیت متابولیکی آن‌ها از جمله آنزیم‌ها می‌شود (فیترتین و همکاران، 2008).

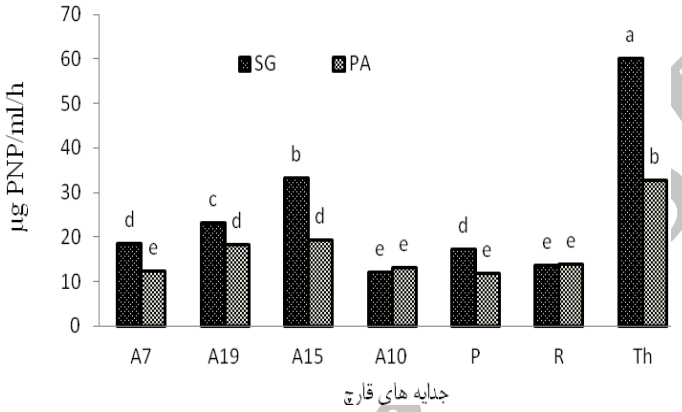
1. *Trichoderma harzianum*

2. *Rhizoctonia solani*

Archive of SID

www.SID.ir

در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم رشد قارچ‌ها با سرعت بیشتری نسبت به زمان صورت گرفت و حتی اسپوردهی قارچ‌ها نیز سریعتر بود. نتایج حاصل از مطالعه فیترتین و همکاران (2008) حاکی از این بود که فعالیت فسفاتاز اسیدی ریزجانداران، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas mallei* ، *Aspergillus niger*، *Penicillium* 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 اسید فیتیک است. اسید فیتیک که فیترتین در تحقیق خود استفاده کرد یک اسید فیتیک خالص شده از دانه برنج با جرم مولکولی 660/4 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 923/8 و فرم مولکولی آن $C_6H_6Na_{12}O_{24}P_6$ می‌باشد. در این نوع اسید فیتیک، 12 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 تأثیر گذار باشد.



شکل 1- تأثیر ترکیبات آلی فسفر و جدایه‌های قارچ بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی

تأثیر زمان بر فعالیت فسفاتاز اسیدی جدایه‌های قارچ در شکل 2 نشان داده شده است. در محور عمودی فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی مشاهده می‌شود و در محور افقی جدایه‌های قارچی می‌باشند در این شکل فعالیت آنزیم در دو زمان 7 و 14 روز بعد از تلقیح نشان داده شده است. بین اکثر جدایه‌ها از لحاظ فعالیت فسفاتاز اسیدی در دو زمان 7 و 14روز اختلاف معنی‌داری وجود دارد($P<0/05$). در روز هفتم در میان جدایه‌های *آسپرژیلوس*، A_{15} بیشترین و A_{10} کمترین فعالیت آنزیمی و در مقایسه کلی بین جدایه‌ها، Th بیشترین و A_{10} کمترین فعالیت را در محیط کشت نشان داده‌اند. در روز چهاردهم در میان جدایه‌های *آسپرژیلوس* A_{15} ،بیشترین و A_{10}کمترین فعالیت و در مقایسه کلی بین جدایه‌ها Th، بیشترین و R کمترین فعالیت آنزیمی را به همراه داشتند.

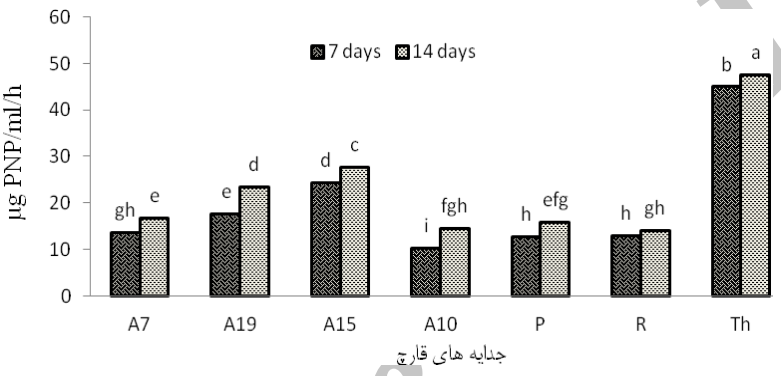
همانطور که در شکل 2 مشاهده شد، با گذشت زمان از 7 تا 14روز فعالیت فسفاتاز اسیدی اکثریت جدایه ها افزایش یافت. در طی بررسی تغییرات فعالیت فسفاتاز اسیدی از 7 تا 14روز مشاهده شد که افزایش فعالیت آنزیمی در اکثریت جدایه‌ها تقریباً به یک نسبت است البته در جدایه A_{19} نسبت به بقیه جدایه‌ها افزایش بیشتری در فعالیت فسفاتاز اسیدی آن با گذشت زمان مشاهده شد و جدایه R نیز گذشت زمان تأثیر زیادی بر فعالیت فسفاتاز اسیدی آن نداشت. زمان یکی از پارامترهایی است که بر فعالیت فسفاتاز محیط کشت قارچ‌ها اثر دارد. در مطالعه حاضر بیشتر جدایه‌ها با گذشت زمان افزایش فعالیت فسفاتاز را داشتند. علت آن ممکن است رشد بیشتر جدایه‌ها در محیط کشت باشد که سبب می‌گردد نیاز به مواد غذایی افزایش یابد و در نتیجه آنزیم‌های بیشتری توسط قارچ‌ها آزاد شوند. یکی دیگر از دلایل افزایش فعالیت آنزیمی در طی زمان ذکر شده ممکن است مربوط به فاز رشدی جدایه‌ها باشد. در طی این فاز جدایه ها رشد سریعتری دارند و فعالیت آنزیمی نیز بیشتر است (یاداو و طرفدار، 2003). آسری و همکاران (2009) طی بررسی که بر تاثیر زمان بر فعالیت آنزیم‌ها انجام دادند، دریافتند که قارچ‌ها در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم، فسفاتاز اسیدی و قلیایی بیشتری تولید کردند که دلیل آن را فراهم بودن عناصر غذایی مکفی برای قارچ‌ها بیان کردند، همچنین آن‌ها ادامه دادند که قارچ‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

دارای مراحل یا فازهای مختلف رشدی می‌باشند که شرایط تولید آنزیم در این فازها متفاوت است.

از طرفی آنها دریافتند که فسفاتاز اسیدی، 21 روز بعد از تلقیح و فسفاتاز قلیایی 14 روز بعد از تلقیح کاهش می‌یابد که ممکن است به علت این باشد که قارچ ها به مرحله ثابتی از رشد رسیده‌اند. همچنین فیترتین و همکاران (2008) دریافتند که فسفاتاز اسیدی ریزجانداران (قارچ‌ها و باکتری‌ها) با گذشت زمان تغییر می‌کند، در مورد قارچ‌ها (*آسپرژیلوس* و پنیسیلیوم) فعالیت آنزیمی با گذشت زمان افزایش پیدا کرد. اما این محقق طی تحقیقی که بر فسفاتاز باکتری‌ها انجام داد، گزارش کرد که هرچه از زمان تلقیح در محیط کشت حاوی اسید فیتیک می‌گذرد فعالیت فسفاتاز کاهش می‌یابد اما در محیط کشتی که از بستره ماده آلی طبیعی (عصاره کود گاوی) استفاده کرد در رابطه با تأثیر زمان بر فعالیت فسفاتاز نتایج متنوعی بدست آمد، در بعضی از جدایه‌ها فعالیت آنزیم بالا رفته و در بعضی از جدایه‌ها فعالیت آنزیم کم شده است (فیترتین و همکاران، 2011). ویس و همکاران (1999)، نیز بیان کردند که فعالیت آنزیمی ریز جانداران در محیط حاوی بستره‌های آلی فسفر با گذشت زمان متفاوت است.



شکل 2- تأثیر زمان و جدایه‌های قارچ بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی

فعالیت فسفاتاز قلیایی جدایه‌های قارچ در دو محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم و اسید فیتیک، در شکل 3 نشان داده شده است. در این شکل نیزگلیسروفسفات سدیم به صورت SG و اسیدفیتیک به صورت PA نمایش داده شده است.در محور عمودی فعالیت فسفاتاز اسیدی و در محور افقی جدایه‌های قارچی هر کدام به صورت علامت اختصاری مشخص شده‌اند، *آسپرژیلوس*ها به ترتیب (A_7، A_{10}، A_{15}، A_{19})، *Trichoderma harzianum* (Th)، *Rhizoctonia solani* (R) و *Penicillium* spp. (P) نمایش داده شده اند.در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم، بین اکثریت جدایه‌ها از لحاظ فسفاتاز قلیایی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد **(P<0/05)**. در میان جدایه‌های *آسپرژیلوس*، A_{15} و A_{19} بیشترین و A_{10} کمترین و در بین کلیه جدایه‌ها، Th بیشترین و A_{10} کمترین فعالیت فسفاتاز قلیایی را نشان دادند.

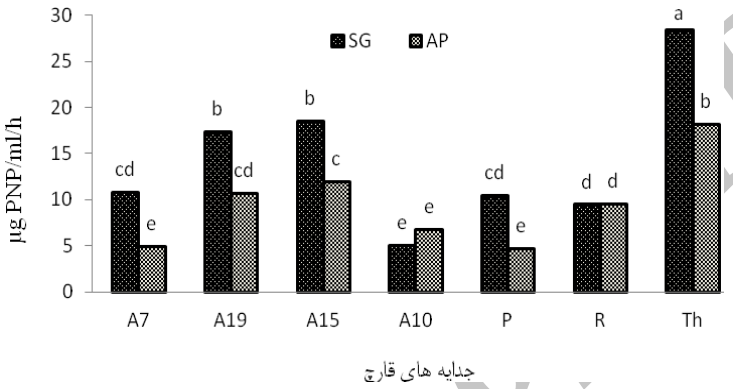
در محیط حاوی اسید فیتیک، در میان جدایه‌های *آسپرژیلوس*، A_{15} و A_{19} بیشترین و A_{10} وA_7 کمترین و در مقایسه کلی جدایه‌ها، Th بیشترین فعالیت فسفاتاز قلیایی را به همراه داشتند. آسری و همکاران (2009) طی مقایسه‌ای که بین گونه‌های *Aspergillus Penicillium* ، *Pseudeurotium zonatum* و *Trichoderma sp* 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. طی تحقیقی که توسط یاداو و طرفدار (2003)، بر گونه‌های مختلف *آسپرژیلوس*، پنیسیلیوم، *امرسیلا* از لحاظ فعالیت فسفاتاز قلیایی صورت گرفت، نشان داد که جدایه‌های *آسپرژیلوس* و از میان آنها گونه *Aspergillus niger* کمترین فعالیت فسفاتاز قلیایی را دارد. اما ماکزیمم فعالیت فسفاتاز قلیایی در جدایه‌های *امرسیلا* و از میان آنها گونه *Emmericella rugulosa* وجود دارد. جدایه‌های پنیسیلیوم در بین این دو گروه قارچ قرار گرفتند. طی مقایسه بین دو نوع ترکیب آلی فسفر، فعالیت فسفاتاز قلیایی اکثر جدایه‌ها در محیط کشت حاوی گلیسرو فسفات سدیم نسبت به محیط حاوی اسید فیتیک بیشتر

Archive of SID

www.SID.ir

است. به غیر از جدایه‌های A_{10} و R که اختلاف معنی‌داری در فعالیت فسفاتاز قلیایی در دو محیط کشت نداشتند.

پس نوع ترکیب آلی بر فعالیت فسفاتاز قلیایی قارچ‌ها نیز اثر دارد. رشد قارچ‌های محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم بهتر از محیط حاوی اسید فیتیک بود و حتی اسپوردهی قارچ‌ها نیز سریعتر بود. شاید دلیل دیگر آن pH پایین‌تری بود که در محیط حاوی اسید فیتیک نسبت به گلیسرو فسفات سدیم ایجاد شد و این عوامل باعث کاهش فعالیت فسفاتاز قلیایی محیط حاوی اسید فیتیک نسبت به گلیسرو فسفات سدیم شده است (یاداو و طرفدار، 2003). الکسیوا و همکاران (2003) عنوان کردند که عوامل مختلفی در آزاد سازی آنزیم اثر دارد از جمله pHمحیط کشت، دمای تلقیح، حجم مایه تلقیح (که اگر این عامل کم باشد بر رشد و بیومس اثر دارد و ممکن است باعث کاهش فعالیت متابولیک‌ها از جمله آزاد سازی فسفاتاز شود)، همچنین نوع منبع کربن محیط کشت (کربن که ترکیب اصلی سلول‌هاست و زمانی که منبع کربن سوخت و ساز پیدا می‌کند اغلب بر تولید متابولیک ها از جمله آنزیم‌ها اثر می‌گذارد که این بسته به نوع و غلظت بستره دارد) .

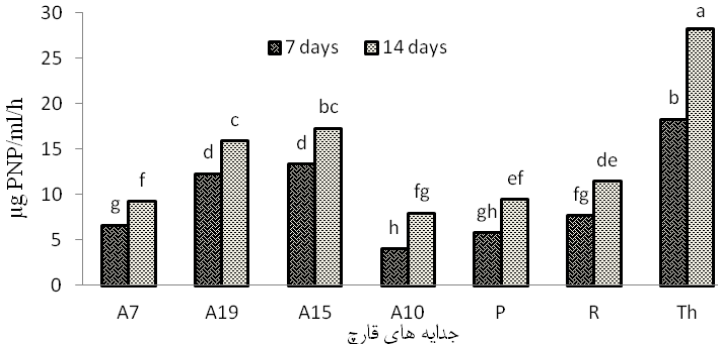


شکل 3- تأثیر ترکیبات آلی فسفر و جدایه‌های قارچ بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

در شکل 4 تأثیر زمان بر فعالیت فسفاتاز قلیایی جدایه‌های قارچ مشاهده شده است. اختلاف معنی‌داری بین فعالیت فسفاتاز قلیایی جدایه‌ها طی دو زمان مشاهده می‌شود. در روز هفتم، در بین جدایه‌های *آسپرژیلوس*، A_{15} و A_{19} بیشترین و A_{10} کمترین و در مقایسه کلی بین جدایه‌ها، Th بیشترین و A_{10} کمترین فعالیت آنزیمی را در محیط کشت نشان داده است. در روز چهاردهم، بین جدایه‌های *آسپرژیلوس*، A_{19} و A_{15} بیشترین و A_7 و A_{10} کمترین و در مقایسه کلی جدایه‌ها، Th بیشترین و A_{10} کمترین فعالیت فسفاتاز قلیایی را به همراه داشتند. با گذشت زمان مشاهده شد که جدایه‌ها در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم فعالیت فسفاتاز قلیایی بیشتری دارند. دلیل آن همانطور که برای آنزیم فسفاتاز اسیدی بیان شد ممکن است تأمین عناصر مکفی برای قارچ‌ها باشد که سبب توانایی بیشتر جهت تولید این آنزیم نیز شده است از طرفی در طی روزهای نخستین فاز سازگاری قارچ با محیط رشد مطرح می‌شود که در این زمان فعالیت متابولیکی جدایه‌ها نیز کم شده و بعد از آن بدلیل رشد مساعدتر فعالیت آنزیمی افزایش می‌یابد. در رابطه با تغییرات فسفاتاز قلیایی در طی دو زمان، تقریباً در اکثر جدایه‌ها افزایش یکسانی مشاهده شد البته به جز Th که فعالیت آنزیمی آن در هفته دوم نسبت به هفته اول از بقیه بیشتر است. شاید شرایط محیط کشت Th در هفته دوم نسبت به بقیه جدایه‌ها بهتر بوده است. در میان جدایه‌ها، *Trichoderma harzianum* در دو زمان مطرح شده بیشترین فعالیت آنزیمی را داشته است و در میان جدایه های *آسپرژیلوس*، جدایه A_{19} و A_{15} بیشترین فعالیت آنزیمی را داشتند. میزان رشد متفاوت قارچ‌ها، میزان pH متفاوت محیط کشت‌ها، جنس قارچ، حتی گونه‌های مختلف یک قارچ نیز از لحاظ فعالیت فسفاتاز قلیایی با هم تفاوت دارند که این به مورفولوژی و خصوصیات ساختاری و متابولیکی قارچ‌ها بر می‌گردد .

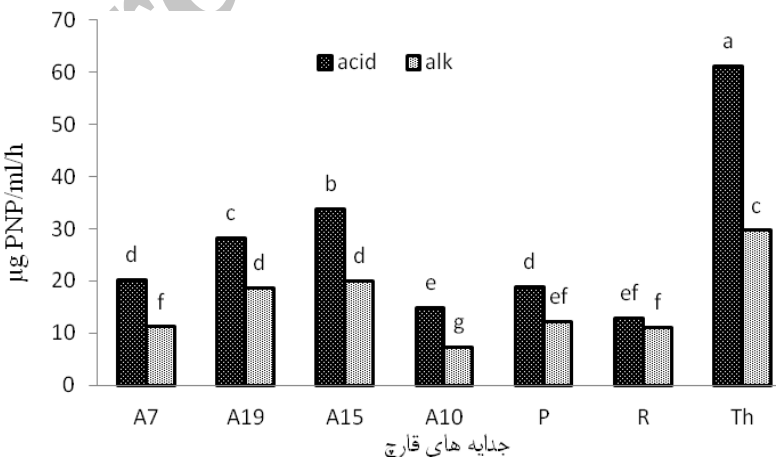
Archive of SID

www.SID.ir



شکل 4- تأثیر زمان و جدایه‌های قارچ بر فعالیت آنزیم فسفاتازقلیایی

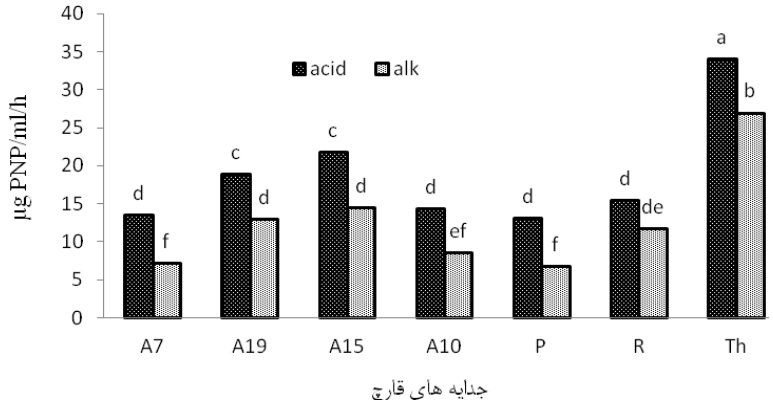
در شکل 5 و 6 فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی (acid) و قلیایی (alk) در دو محیط کشت مقایسه شده است. در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم و اسید فیتیک، فعالیت فسفاتاز اسیدی بیشتر از قلیایی مشاهده شده است. شاید دلیل آن این است که قارچ‌ها با گذشت زمان سبب کاهش pH در محیط شده‌اند که این کاهش pH به دلیل تولید اسیدهای آلی مختلف توسط قارچ‌ها می‌باشد (با اندازه‌گیری pH در زمان عصاره‌گیری در دو زمان 7 و 14 روز بعد از تلقیح، کاهش آن در طول آزمایش مشاهده شد)، در شرایط اسیدی، تولید فسفاتاز اسیدی بیشتر از قلیایی است. آسری و همکاران (2009) در رابطه با فسفاتاز اسیدی و قلیایی گزارش کردند که قارچ‌ها فسفاتاز اسیدی را بیشتر از فسفاتاز قلیایی در محیط کشت خود آزاد می‌کنند که این با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت. در بررسی دیگر جهت مقایسه فسفاتازهای اسیدی و قلیایی توسط قارچ‌های *فیلامنتوس* در محیط کشت مایع و عصاره میسیلیوم (اسکومیسیت‌ها، باسیدومیسیت‌ها و زیگومیسیت‌ها)، فعالیت بالاتری از فسفاتازهای اسیدی خارج سلولی در عصاره میسیلیومی و فعالیت پایین‌تری از فسفاتازهای قلیایی در اسکومیسیت‌ها مشاهده شد، فسفاتازهای اسیدی در باسیدومیسیت‌ها حضور داشتند اما در زیگومیسیت‌ها فقط در عصاره میسیلیوم، فعالیت فسفاتاز قلیایی مشاهده شد (رییز و همکاران، 2008). طی تحقیقی که توسط پاندی و همکاران (2007) بر حلالیت فسفات توسط گونه‌های پنی سیلیوم صورت گرفت، گزارش کردند که فعالیت فسفاتاز اسیدی بیشتر از فسفاتاز قلیایی است و نسبت آن به 1/5 تا 2 برابر رسیده است. یاداو و طرفدار (2003) نیز همین نتیجه را دریافت کردند که فعالیت فسفاتاز اسیدی به فسفاتاز قلیایی در محیط کشت قارچ‌های مورد بررسی آن ها تا 3 برابر نیز رسیده است.



شکل 5- مقایسه فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌ها در محیط کشت گلیسرو فسفات

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 6- مقایسه فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌ها در محیط کشت اسید فیتیک

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد، جدایه‌های قارچ از لحاظ فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی خارج سلولی اختلاف معنی‌داری با همدیگر داشتند. در میان جدایه‌های *آسپرژیلوس*، بیشترین فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی در محیط کشت *Aspergillus niger* (A_{15}) مشاهده شد. در مقایسه بین کلیه جدایه‌ها، محیط کشت *Trichoderma harzianum* (Th) بیشترین فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی را نشان داد. نوع ترکیبات آلی فسفردار نیز بر فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌های قارچ تأثیرگذاشته است، فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌های محیط کشت گلیسرو فسفات سدیم بیشتراز اسید فیتیک بودند. همچنین با گذشت زمان فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌های قارچ افزایش یافت. علاوه بر آن، نتایج نشان داد که فعالیت فسفاتاز اسیدی محیط کشت قارچ‌ها بیشتر از فعالیت فسفاتاز قلیایی است.

جدول آنالیز واریانس فسفاتاز اسیدی

K Value Prob	Source	Degrees of Freedom	Sum ofSquares	Mean Square	F Value
2 0.0000	Factor A	6	10483.283	1747.214	474.1844
4 0.0000	Factor B	1	235.679	235.679	63.9621
6 0.1457	AB	6	36.897	6.150	1.6690
8 0.0000	Factor C	1	1381.474	1381.474	374.9245
10 0.0000	AC	6	1716.257	286.043	77.6305
12 0.2991	BC	1	4.048	4.048	1.0986
14 0.0011	ABC	6	97.103	16.184	4.3922
-15	Error	56	206.342	3.685	
	Total	83	14161.083		

جدول آنالیز واریانس فسفاتاز قلیایی

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum	Mean Square	F Value	Prob
2	Factor A	6	26	442.125	142.8166	0.0000
4	Factor B	1	4	429.703	138.8041	0.0000
6	AB	6	11	18.429	5.9530	0.0001
8	Factor C	1	476.148	476.148	153.8068	0.0000
10	AC	6	311.153	51.859	16.7516	0.0000
12	BC	1	50.101	50.101	16.1839	0.0002
14	ABC	6	125.222	20.870	6.7416	0.0000
-15	Error	56	173.362	3.096		
	Total	83	4329.010			

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع:

۱. مهرآوران، ح. 1372. مبانی قارچ‌ها. انتشارات دانشگاه ارومیه. 531 صفحه.

2. 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.
3. 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.
4. Brinch-Pederson, H., Dahl-Sorensen, L. and Holm P. B. 2002. Engineering crop plants:getting ahandle on phosphate. Plant Science 7: 118-120.
5. Fitriatin B.N., Subroto T. and Joy B. 2008. The Influence of Organic Phosphorous Substrate on Phosphatase Activity of Soil Microbes. p. 666. In: Proceeding of the International Seminar on Chemistry,October, 30-31.
6. 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.
7. Fujita, J., Yamane, Y., Yasuzo, K., Saburo, W. and Seiko Shigeta. 2002. Production and properties of phytase and acid phosphatase froma sake koji mold, Aspergillus oryzae. Journal of Bioscience and Bioengineerin 95:348-353.
8. Guimaraes, L.H.S., Simone, C.P.N. and Michele M. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiolog 37:474-480.
9. Hubel, F. and 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.
10. Haros, M., Bielicka, M. and Sanz, Y. 2005. Phytase activity as a novel metabolic feature in Biofidiobacterium. FEMS Microbiology Letters 247: 231-239.
11. Jennings D. H. 1995. The Physiology of Fungal Nutrition. Cambridge University press, University of Liverpool.
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. Philip, A., Thomas, J. and Xiaodun, He. 2008. Bioavailability Of Organically-Bound Soil Phophorous.
14. Pandey, A., Namrata, D., Rinu, K. and Pankaj T. 2007. Phosphate solubilization by Penicillium spp isolated from soil samples of Indian Himalayan region. World Journal of Microbiology and Biotecnology 24(1):97-102.
15. Papagianni, M., Nokes, S.E. and Filer, K. 1999. Production of phytase by Aspergillus niger in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry 35:397-402.
16. Reyes, F., Villanueva, P. and Alfonso, C. 2008. Comparative study of acid and alkaline phosphatase during the autolysis of filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 10:175-177.
17. Richards, B. N. 1987. The microbiology of terrestrial ecosystem. plant nutrition and soil science 150: 418-1987.
18. Saparatka, N. 2003. Phosphatase activities (ACP- ALP) in Agro ecosystem Soils. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.
19. 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.
20. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

21. Tsekova, K., Galabova, D., Todorova, K. and Ilieva, S. 2002. Phosphatase activity and copper uptake during growth of Aspergillus niger. Process Biochemistry 37:753-758.
22. Turner, B.L., Frossard, E. and Baldwin, D.S. 2005. Organic Phosphorus in the Environment. CABI Publishing Series. 412.
23. Vats, P. and Banerjee, U.C. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases).Enzyme and Microbial Technology 35:3-14.
24. Youn, Han. and Daniel, G. 2006. Phosphatase production by Aspergillus ficuum. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2: 195-200.
25. 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
26. Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhell, G., Lohmann M. and van Loon, A.P. G.M. 1999. Biochemical characterization of fungal phytase (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases) catalytic properties. Appied and Environmental Microbiology 65:267-373.

Archive of SID

www.SID.ir