بررسی انحلال پذیری سنگ فسفر توسط قارچ بومی جدا شده از معدن سنگ فسفات دلیر

راحله جمشیدی [۱]، بهی جلیلی [۲]، محمد علی بهمنیار [۳]، سروش سالک گیلانی [۴]
۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد، ۲- استادیار گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ۳- استاد گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ۳- مربی گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

چکیده
استفاده از میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفر از منابع نامحلول سنگ فسفات روشی امیدوار کننده است که نه تنها منجر به کاهش آلودگی زیست محیطی می‌شود بلکه مقرون به صرفه و اقتصادی نیز می‌باشد. در این مطالعه، یک قارچ حل کننده فسفات متعلق به سکشن *Aspergillus* nigri از خاک معدن سنگ فسفات دلیر واقع در شهرستان چالوس جداسازی شد. نتایج نشان داد که این سویه قارچی توانایی بالایی در انحلال فسفر در محیط کشت حاوی سنگ فسفات به عنوان تنها منبع فسفر دارد. به طوری که قادر به انحلال ۳۴۷ mg/Lفسفر در محیط کشت مایع در مدت ۹ روز انکوباسیون شد. احتمالا، اسیدی شدن محیط کشت مهم‌ترین مکانیسم برای انحلال سنگ فسفات می‌باشد.

واژه های کلیدي: سنگ فسفر، آسپرژیلوس، انحلال.

مقدمه
فسفر یکی از عناصر پر مصرف برای گیاهان است (Gunes et al., ۲۰۰۹) و در جایگاه دوم بعد از نیتروژن قرار دارد (Pradhan and sukla., ۲۰۰۵). فسفر عمدتا به دو فرم آلی و معدنی در خاک‌ها وجود دارد و هر دو به عنوان منبع فسفر برای گیاهان پر اهمیت هستند (Yadav and Verma., ۲۰۱۲). بهر حال، ریشه گیاهان تنها قادر به جذب فسفر به صورت آنیون‌های ارتوفسفات (HPO_4^{2-} و $H_2PO_4^-$) از محلول خاک می‌باشد (Richardson et al., ۲۰۰۹). خاک‌های بسیاری در سراسر جهان دچار کمبود فسفر هستند، زیرا بیشتر فسفر در خاک به شکل املاح فلزی نامحلول (Jain et al., ۲۰۱۲) به صورت اکسیدهای آهن و آلومینیوم و اکسیدهای کلسیم به ترتیب در خاک‌های اسیدی و خاک‌های قلیایی تثبیت می‌شود (Deepa et al., ۲۰۱۰).
کمبود فسفر به نوبه خود به شدت رشد و عملکرد گیاهان را محدود می‌سازد. اگرچه مسئله کمبود فسفر به وسیله استفاده مکرر از کود فسفردار تا حصول حداکثر بازده گیاه معمولا برطرف می‌گردد. ولی استفاده بی‌رویه و نامعقول از کودهای شیمیایی فسفردار منجر به تقلیل حاصلخیزی خاک از طریق کاهش تنوع میکروبی شده و در نتیجه بازده محصولات زراعی را می‌کاهد (Khan et al., ۲۰۱۰). کودهای فسفردار علاوه بر گران بودن، از لحاظ زیست محیطی نیز دارای اثرات نامطلوبی هستند و (Singh and Reddy., ۲۰۱۱) تولید آن‌ها نیاز به یک منبع فسیلی دارد (Khan et al., ۲۰۱۰). همچنین، بخش عمده ای از کود شیمیایی فسفردار پس از اعمال به سرعت بی‌حرکت شده (Jain et al., ۲۰۱۲) و تنها بخش کوچکی از آن مورد استفاده گیاهان قرار می‌گیرد (Gunes et al., ۲۰۰۹). در سال‌های اخیر استفاده از میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفر و منابع کم محلول‌تر و ارزان‌تر فسفر مانند سنگ فسفات به منظور افزایش فسفر قابل دسترس بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Chai et al., ۲۰۱۱). میکرو ارگانیسم‌های حل کننده فسفر خاک می‌توانند تاثیر قابل توجهی بر چرخه‌ی فسفر در اکوسیستم‌های طبیعی و کشاورزی داشته باشند (Reyes et al., ۱۹۹۹). این میکروارگانیسم‌ها در آزادسازی فسفر از منابع معدنی به واسطه‌ی انحلال یا معدنی شدن از منابع آلی موثرند (Khan et al., ۲۰۱۰). میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفر شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار هستند. در این میان قارچ‌های حل کننده فسفر به دلیل قدرت رقابتی ساپروفیتی و تحمل به فلزات سنگین، مواد شیمیایی، قارچ کش‌ها و دما بیشتر حائز اهمیت می‌باشند و ۱/۰ تا ۵/۰% از کل جمعیت قارچی خاک را تشکیل می‌دهند (Khan et al., ۲۰۱۰). پژوهشی مبنی بر انحلال سنگ فسفر توسط قارچ‌های بومی در ایران گزارش نشده است. از این رو قارچ آزادزی حل کننده فسفر از معدن فسفر دلیر چالوس جدا سازی شد و توانایی آن برای انحلال غلظت‌های متفاوت سنگ فسفر مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها
مکان نمونه برداری
نمونه‌های خاک و سنگ فسفات برای جداسازی قارچ حل کننده فسفر از معدن فسفات دلیر واقع در دهکده دلیر با ارتفاع ۲۰۹۰ متر از سطح دریا جمع آوری شدند. محدوده فسفات دار دلیر در ۶۶ کیلومتری جنوب چالوس واقع شده است. افق فسفریتی ۵ کیلومتر طول دارد. این افق بر روی دولومتی میانی سازند سلطانیه واقع گردیده است. حداکثر ضخامت افق ۵ متر و حداکثر عیار

۶۳/۲۰ درصد P_2O_5 می‌باشد. منطقه دلیر دارای ۲۳ میلیون تن ذخیره احتمالی با عیار متوسط ۱۶/۱۱ درصد P_2O_5 و ۵۴/۳ متر ضخامت می‌باشد.

نمونه برداری

بیش از ۲۵ نقطه به صورت تصادفی از سنگ و خاک معدن فسفر دلیر انتخاب شد و نمونه‌ها از لایه‌ی ۳۰- ۱ سانتی متری سطح خاک جمع آوری شدند. تمامی آن‌ها قبل از استفاده به طور کامل مخلوط شدند و سپس یک سوم از هر نمونه در دمای ۴ °C برای انجام آزمایش‌های میکروبی نگه‌داری شدند. بقیه به مدت ۳ روز هوا خشک شدند و پس از رد کردن از الک ۲ مش در کیسه‌های پلاستیکی نگه‌داری شدند.

جداسازی قارچ حل کننده فسفر

دقیقا ۱۰ g از هر نمونه به ۹۵ mL آب مقطر افزوده شد و بوسیله شیکر (Edmund Buhler) در سرعت ۱۲۰ rpm تکان داده شدند. سپس سوسپانسیون حاصله به طور متوالی رقیق شده و ۱/۰ mL از هر رقت در شرایط استریل (زیر هود لامینار) روی پلیت حاوی محیط کشت NBRIP-BPB[۱۲۵] (Nautiyal., ۱۹۹۹) پخش شد. ترکیبات موجود در محیط کشت NBRIP-BPB در جدول ۱ آمده است. پلیت‌های NBRIP-BPB در دمای ۲۸ ± ۲ °C نگه‌داری شدند.

پس از گذشت ۵ روز از کشت، گونه های حل کننده فسفر با تغییر رنگ محیط کشت از آبی به زرد و همچنین ایجاد هاله روشن اطراف کلنی شان شناسایی شدند. کلنی که هاله روشن وسیع‌تری ایجاد کرده بود به منظور خالص سازی روی محیط کشت PDA[۱۲۶] در دمای ۲۸ ± ۲ °C کشت داده شد.

جدول ۱- ترکیبات موجود در محیط کشت NBRIP

ماده	گلوکز	$Ca_3(PO_4)_2$	$MgSO_4.7H_2O$	$MgCl_2.6H_2O$	KCl	$(NH_4)_2SO_4$	BPB	آگار
مقدار (g/l)	۱۰	۵	۲۵/۰	۵	۲/۰	۱/۰	۰۲۵/۰	۱۵

شناسایی سویه قارچی جدا شده

جدایه قارچی بر اساس تجزیه و تحلیل توالی ژن ۱۸S-۲۸S rDNA نیز شناسایی شد. DNA ژنومی کل با استفاده از کیت DNeasy Plant Mini (۶۹۱۰۴; QIAGEN) استخراج شد. PCR (واکنش زنجیره ای پلیمراز) rDNA ۱۸S-۲۸S با استفاده از پرایمر فوروارد (مستقیم) (۵'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-۳') و پرایمر ریورس (معکوس) (۵'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-۳') انجام شد. تکنیک PCR در ترموسایکلر (Thermo PCYL۲۲۰; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) انجام شد و محصولات PCR حاصل با استفاده از کیت خالص سازی ستون اسپین PCR EZ-۱۰ (BS۳۶۴; Bio Basic Inc.) خالص سازی شدند و در نهایت توالی محصولات PCR با مجموعه داده‌های بانک ژن مقایسه شد.

خصوصیات سنگ فسفر

سنگ فسفر استفاده شده در این آزمایش با غلظت ۱۳/۹%، از مجتمع صنعتی و معدنی فسفات اسفوردی (معدن فسفر در ۳۵ کیلومتری شمال شرق شهرستان بافق در استان یزد واقع شده است) تهیه گردید.

محیط کشت و شرایط انحلال

پس از گذشت یک هفته از کشت روی محیط کشت PDA اسپورهای قارچی توسط محلول استریل (w/v) ۲/۰% Tween ۸۰ برداشت شدند و به ظرف شیشه‌ای استریل حاوی آب مقطر استریل منتقل گردیدند. سوسپانسیون سلولی قارچ ایزوله شده به وسیله‌ی لام هموسیتومتر[۱۲۷] توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ شمارش گردید. آزمایشات انحلال سنگ فسفر در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ mL محیط کشت براث NBRIP (بدون آگار) و ۰%، ۱%، ۲%، ۴% و ۸% سنگ فسفر به عنوان تنها منبع فسفر در ۳ تکرار انجام گرفت. میزان ۱۰۷ اسپور به هر ارلن مایر اضافه گردید. ارلن مایرها به مدت ۱۵ روز در دمای اتاق بوسیله شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm تکان داده شدند. تغییرات pH توسط pH متر (Jenway, ۳۵۲۰) و فسفر آزاد شده به روش Murphy and Riley (۱۹۶۲) توسط اسپکتوفتومتر (PG instruments, T۹۰+ UV/VIS spectrophotometer) هر ۳ روز یک بار اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Statistix ۸.۰ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Tukey در سطح ۵% انجام شد.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی قارچ حل کننده فسفر

غربالگری قارچ‌های حل کننده فسفر از معدن سنگ فسفات بر روی پلیت انجام شد. تمامی ۵ جدایه قادر به تولید هاله بودند که نشان دهنده پتانسیل انحلال فسفر است. یکی از جدایه‌ها قادر به تولید هاله بسیار واضح و بزرگ در کمتر از ۵ روز در اطراف

[۱۲۵] National Botanical Research Institute's Phosphate-Bromo Phenol Blue
[۱۲۶] Potato Dextrose Agar
[۱۲۷] Hemocytometer

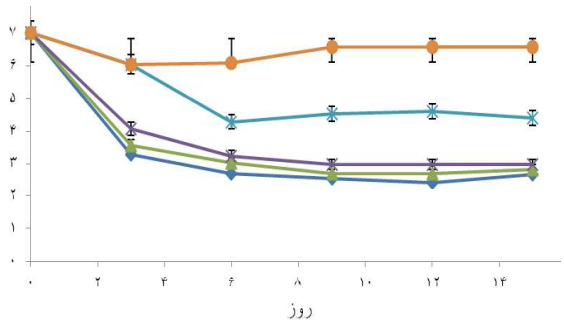
میسلیوم قارچی بود از این رو جدایه مذکور برای مطالعات بیشتر انتخاب شد. شناسایی این جدایه بر اساس داده‌های مولکولی و انطباق نتایج با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد، جدایه مورد شناسایی متعلق به سکشن Nigri می‌باشد.

TGGTWCGAGKCTGTCTTTGGGCCAACCTCCCATCCGT
GTCTATTATACCCTTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTG
TCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCCGGGCCCG
TGCCCSCCGGAGACTTTGAACGCACWTTGCGCCCCCT
GGTATTCCTTCYACAGCAARCKKTGGMATATCKCWA
KTSKTKRGTRTASRKATCACAAATCAGARWAGATTRA
TMGARCKRCAGCKYYSGGTGRGGCTATCSCAMWGWR
SAGCCCAATGYGAACAWSAYCGAGTAMCAKCRMMTT
ATYTMARCACSAAGACMTWRTTACACTCTSCCMWYR
CWYSSAGRRRRATRGYGAGCATATMTSACSCWRCTGY
MMCWMGTRTTGYATTCGWGYYTMTATCGTTRGCAKT
TGACKKSTCKGKGATSGSSGCTCCRCTA

شکل ۱. بخشی از نتایج توالی یابی با استفاده از پرایمر ITS

تغییرات pH در محیط کشت

تغییرات pH در محیط کشت در خلال آزمایشات ۱۵ روزه انکوباسیون در شکل ۲ نشان داده شده است. مقدار pH اولیه محیط کشت برای تمامی تیمارها ۷ بود. اما پس از ۹ روز این مقدار در غلظت‌های ۱%، ۲%، ۴% و ۸% سنگ فسفات به ترتیب به ۷/۲، ۹۸/۲، ۵۴/۴ و ۵۸/۶ کاهش یافت.



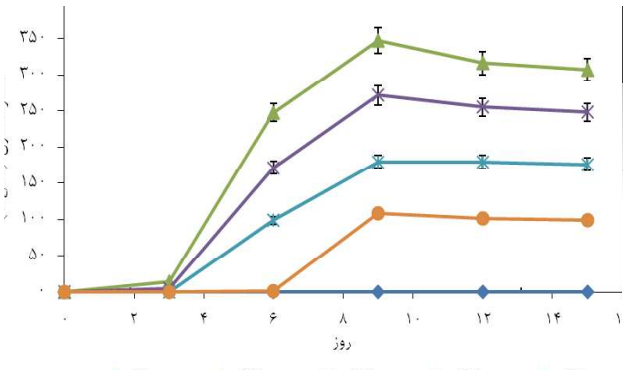
شکل۲- انحلال فسفر در طی زمان انکوباسیون در غلظت‌های مختلف سنگ فسفات

غلظت زیاد سنگ فسفر در محیط کشت منجر به ظرفیت بافری بیشتر شده؛ بنابراین تغییر کمتری در میزان pH در غلظت‌های بالاتر سنگ فسفات به چشم می‌خورد. اسیدی شدن محیط کشت در خلال رشد قارچ می‌تواند به علت چهار فرایند (۱) تراوش پروتون به واسطه انتقال پروتون از غشاء پلاسمایی؛ (۲) جذب عناصر غذایی و آزاد سازی پروتون معادل؛ (۳) تراوش اسیدهای آلی و (۴) تولید دی اکسید کربن در نتیجه فعالیت تنفسی قارچ باشد (Burgstaller and Schinner, ۱۹۹۳).

انحلال سنگ فسفر

میزان فسفر محلول در محیط کشت در خلال آزمایشات ۱۵ روزه انحلال فسفر در غلظت‌های مختلف سنگ فسفات در شکل ۳ نشان داده شده است. بیشترین غلظت فسفات آزاد شده در محیط کشت برای تمامی تیمارها پس از سپری شدن ۹ روز از انکوباسیون به دست آمد و به طور کلی میزان فسفر آزاد شده با افزایش غلظت سنگ فسفات کاهش یافت. به طوری که بیشترین میزان انحلال فسفر در غلظت ۱% سنگ فسفات به میزان ۰۷/۳۴۷ mg/L رخ داد و در غلظت‌های ۲%، ۴% و ۸% سنگ فسفات به

ترتیب ۶/۲۷۱، ۵/۱۷۹ و ۱۰۸ mg/L فسفر در محیط کشت یافت شد. نتایج همچنین نشان می‌دهد که مقدار فسفر محلول آزاد شده در محیط کشت بعد از روز ۹ ام ثابت مانده است. این امر می‌توانند مرتبط با فراهمی فسفر محلول باشد که اثر بازدارنده ای بر انحلال بیشتر سنگ فسفات دارد یا به علت تخلیه منبع کربنی برای تولید اسیدهای آلی و فعالیت میکروبی باشد. در تمامی موارد انحلال سنگ فسفات همراه با کاهش معنی دار pH بود. در تیمار کنترل میزان آزاد سازی فسفر ناچیز بود. انحلال فرم‌های مختلف فسفات معدنی توسط آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و مخمر گزارش شده است. گونه های مختلف آسپرژیلویس شامل آسپرژیلوس توبینجنسیس (Aspergillus tubingensis)، آسپرژیلوس نایجر (Aspergillus niger) و آسپرژیلوس آواموری (Aspergillus awamori) قادر به انحلال فسفات‌های نامحلول می‌باشند (Reddy et al., ۲۰۰۲، Schneider et al., ۲۰۱۰ و Jain et al, ۲۰۱۰). نقش میکروارگانیسم های حل کننده فسفر در انحلال فسفات عمدتا مرتبط با توانایی آن‌ها در کاهش pH محیط در نتیجه تولید اسیدهای آلی می‌باشد. آزاد سازی پروتون در طی تنفس یا اسیمیلاسیون NH۴+ از دیگر دلایل ممکن برای انحلال سنگ فسفات است. بهر حال، مطالعات بیشتری برای درک مکانیسم انحلال سنگ فسفات توسط سویه مورد استفاده در این آزمایش مورد نیاز است.



شکل ۳- انحلال فسفر در طی زمان انکوباسیون در غلظت‌های مختلف سنگ فسفات.

منابع

Analytical Software. ۲۰۰۷. Statistix : version ۲. Analytical Software, Florida.

Burgstaller, W., Schinner. F.۱۹۹۳. Leaching of metals with fungi. Journal of Biotechnology, ۲۷ : ۹۱-۱۱۶.

Chai, B., Wu, Y., Liu, P., Liu, B. and Gao, M. ۲۰۱۱. Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine. Journal of Basic Microbiology, ۵۱ : ۵-۱۴.

Deepa, V., Prasanna, A., Murthy, B. P. and Sridhar, R. ۲۰۱۰. Efficient phosphate solubilizing by fungal strains isolated from rice-rhizosphere soils for the phosphorus release. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, ۶ : ۴۸۷-۴۹۲.

Gunes, A., Ataoglu, N., Turan, M., Esitken, A. and Ketterings, Q. M. ۲۰۰۹. Effects of phosphate-solubilizing microorganisms on strawberry yield and nutrient concentrations. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, ۱۷۲ : ۳۸۵-۳۹۲.

Jain, R., Saxena, J. and Sharma, V. ۲۰۱۰. The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system. Applied soil ecology, ۴۶ : ۹۰-۹۴.

Jain, R., Saxena, J. and Sharma, V. ۲۰۱۲. Effect of phosphate- solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S۲۹ on mungbean (*Vigna radiate* cv.RMG ۴۹۲) growth. Folia Microbiologica, ۵۷ : ۵۳۳-۵۴۱.

Khan, M. S., Ziadi, A., Ahemad, M., Oves, M. and Wani P.A. ۲۰۱۰. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi- current perspective. Archives of Agronomy and soil Science, ۵۶ : ۷۳- ۹۸.

Murphy, J., and Riley, J. P. ۱۹۶۲. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica chimica acta, ۲۷ :۳۱-۳۶.

Nautiyal, C.S. ۱۹۹۹. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology, ۱۷۰ : ۲۶۵-۲۷۰.

Pradhan, N. and Sukla, L. B. ۲۰۰۵. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. African Journal of Biotechnology, ۵ : ۸۵۰-۸۵۴.

Reddy, M. S., Kumar S., Babita, K. and Reddy M.S. ۲۰۰۲. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, ۸۴: ۱۸۷-۱۸۹.

Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R., Tanguay, P. and Antoun, H. ۱۹۹۹. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV- induced mutants. FEMS Microbiology Ecology, ۲۸: ۲۹۱-۲۹۵.

Richardson, A. E., Hocking, P.J., Simpson, R.J. and George, T.S. ۲۰۰۹. Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus. Crop & Pasture Science, ۶۰: ۱۲۴-۱۴۳.

Singh, H. and Reddy, S. M. ۲۰۱۱. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. European Journal of soil Biology, ۴۷: ۳۰-۳۴.

Schneider, K. D., Straaten, V. P., Mira de Orduna, R., Glasauer, S., Trevors, J. and Fallow, D. ۲۰۱۰. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. Journal of Applied Microbiology, ۱۰۸: ۳۶۶-۳۷۴.

Yadav, B.K. and Verma, A. ۲۰۱۲. Phosphate solubilization and mobilization in soil through microorganisms under arid ecosystems. The Functioning of Ecosystems. A. Mahamane (Ed.). ISBN: ۹۷۸-۹۵۳-۵۱-۰۵۷۳-۲, In Tech, ۹۳-۱۰۸.

Abstract

The use of microorganisms to solubilize elemental phosphorus from insoluble rock phosphate is a hopeful method to decrease not only environmental pollution but also production costs. In this study, a phosphate-solublizing fungus (PSF) was isolated from phosphate mine (Dalir, Challus, Mazandaran) and identified based on ۱۸S-۲۸S rDNA as species belonging to section nigri. This PSF solubilized ۳۴۷ mg/L of rock phosphate into the liquid medium. Acidification of culture medium seemed to be the main mechanism for rock phosphate solubilization.

Key words: rock phosphate, Aspergillus, solubilization.