پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

تاثیر فیتازهای تولید شده از منابع قارچی بر میزان حلالیت فسفر آلی

تکتم ولی زاده حجار[۱]، امیرلکزیان[۲]، مجید مجیدزاده هروی [۳]، اکرم حلاج نیا[۴]

[۱] - دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، [۲] - استاد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، [۳] - استادیار،گروه علوم دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، [۴]- دانشیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

در این تحقیق ابتدا به صورت کیفی و سپس به صورت کمی میزان فعالیت آنزیم فیتاز از گونه‌های قارچی بررسی شد. نتایج نشان داد سه گونه قارچ آسپرژیلوس بر فعالیت آنزیم فیتاز و میزان حل شدن فسفر از منبع آلی در (P≤۰/۰۱) معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم فیتاز در بین این سه گونه قارچ آسپرژیلوس، در گونه *آسپرژیلوس نایجر* از دو گونه دیگر بیشتر بوده و مقدار آن ۱۶/۷ میکرومول در دقیقه بود. قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* نیز با دارا بودن مقدار فعالیت آنزیمی ۴/۶۶ میکرومول در دقیقه کم‌ترین فعالیت آنزیمی را در بین سه گونه داشت. گونه *آسپرژیلوس نایجر* در حل کردن فسفر از منبع آلی فیتات سدیم نیز بهتر عمل کرده و میزان فسفر محلول در این تیمار نسبت به دو گونه دیگر اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۱)داشت. کم‌ترین میزان فسفر محلول مربوط به گونه *آسپرژیلوس فلاووس* بود.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فامیگاتوس ،آسپرژیلوس فلاووس ،فسفرآلی،فیتات سدیم، فیتاز

مقدمه

فسفر عنصر غذایی محدود کننده‌ای برای سیستم‌های بیولوژیکی در محیط خاک می‌باشد. مقدار زیادی از فسفر وارد شده به خاک توسط کود، به سرعت از دسترس گیاه خارج می‌گردد و در بخش‌های معدنی خاک انباشته می‌شود؛ که علت آن ناشی از فرآیندهای شیمیایی جذب و رسوب است. مقداری از آن نیز در مواد آلی خاک غیر متحرک می‌گردند (کائولی وهمکاران، ۲۰۰۷). در این بین نکته قابل توجه این است که بسیاری از خاک‌ها دارای مقادیر زیادی فسفر می‌باشند که اگر کل آن قابل استفاده باشد، بیش از نیازهای رشد گیاهان و میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (ریچاردسون و همکاران، ۲۰۰۵). بیش‌ترین بخش فسفر آلی (حدود ۵۰ درصد) را اینوزیتول فسفات تشکیل می‌دهد.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 (هابل و بک، ۱۹۹۱). فراوانی فیتات‌ها و دیگر فسفات‌های آلی در خاک به دلیل حلالیت پایین آن‌هاست. از طرف دیگر این ترکیبات اتصالات محکمی با فاز جامد خاک دارند و این باعث پایداری بسیار بالای آن‌ها در خاک می‌شود (ترنر و همکاران، ۲۰۰۵). فراهمی بیولوژیکی اینوزیتول فسفات به هیدرولیز آن‌ها توسط فیتاز بستگی دارد. فیتازها به گروهی از آنزیم‌ها اطلاق می‌شود که حداقل یک گروه فسفات از مولکول فیتات را جدا نمایند. فیتازها به‌طور متوالی اینوزیتول هگزاکیس فسفات‌ها را به رده‌های پایینی مختلفی از استرها شامل منواسترهای اینوزیتول هیدرولیز می‌کنند. با توجه به فقدان فیتازهای برون سلولی از منشأ گیاهی و میکروارگانیسم‌های خاک، به نظر می‌رسد که میکروارگانیسم‌ها کلیدی برای چرخه فسفر از منشأ اینوزیتول فسفات در خاک می‌باشند. فیتازهای برون سلولی از منشأ باکتریایی و قارچی می‌توانند حلالیت عنصر غذایی فسفر را زمانی که در ریزوسفر موجود است را بهبود بخشند. فراهمی، پایداری و فعالیت فیتاز تراوش شده برای معدنی شدن به احتمال زیاد عامل مهمی در چگونگی استفاده از آن‌ها در خاک می‌باشد. پنی‌سیلیوم و آسپرژیلوس از جمله قارچ‌ها و سودوموناس و باسیلوس از جمله باکتری‌های حل کننده فسفات هستند که میزان معدنی شدن فسفر توسط آن‌ها بستگی به فعالیت میکروبی و فعالیت فسفاتازها دارد.

روش های مختلفی از قبیل روش کمی و کیفی آزمایشگاهی برای تعیین فعالیت آنزیم فیتاز در محیط کشت وجود دارند. تاکنون ارتباط بین روش‌های اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در بخش آزمایشگاهی و آن‌چه که در عمل و در محیط خاک اتفاق می‌افتد به خوبی مورد بررسی قرار نگرفته است. تخمین هر چه بهتر موثر بودن یک گونه در بخش عملی یا همان شرایط واقعی خاک به انتخاب روش‌های مناسب تخمین عملکرد در بخش آزمایشگاهی بستگی دارد. بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی فعالیت آنزیم فیتاز سه گونه قارچ آسپرژیلوس به صورت کمی و کیفی و انتخاب بهترین گونه در این مورد بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ابتدا به صورت کیفی و سپس به صورت کمی میزان فعالیت آنزیم فیتاز بررسی شد. بدین منظور سه گونه قارچی شامل: *آسپرژیلوس نایجر* (تهیه شده از گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی مشهد)، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فامیگاتوس* (تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) تهیه شدند. تمام گونه‌ها بر روی محیط کشت عمومی PDA (هر لیتر آب مقطر :عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم گلوکز، ۱ گرم عصاره مخمر دیفکو و ۲۰ گرم آگار) کشت شدند و نمونه ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.

ارزیابی نیمه کمی انحلال فسفات های آلی:

به منظور ارزیابی انحلال فسفات های نامحلول، جدایه‌ها در محیط synthetic minimum medium (SMM) (گلوکز، ۵؛ نیترات سدیم یا نیترات آمونیوم، ۲؛ سولفات منیزیم، ۰/۵؛ کلرید پتاسیم، ۰/۵ و سولفات آهن، ۰/۰۱ گرم در لیتر) شامل منبع فسفر آلی (فیتات سدیم) به میزان ۵ گرم در لیتر به عنوان تنها منبع فسفر مایه زنی شد. پس از ۵ روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد ، میزان فسفر معدنی ازاد شده اندازه گیری شد.

سنجش میزان فسفر آزاد شده در محیط:

پس از ۵ روز کشت‌ها سانتریفوژ شدند (g۷۰۰۰ به مدت ده دقیقه) و ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی عبور داده شده از کاغذ صافی واتمن ۴۲ برای اندازه‌گیری فسفر استفاده شد. فسفر محلول در نمونه‌ها با استفاده از روش مورفی و ریلی (۱۹۶۲) و به روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد. در این روش ابتدا معرف مخلوط شامل ۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۲/۵ مولار، ۱۵ میلی لیتر محلول مولیبدات آمونیوم ۰/۰۳۲مولار، ۳۰ میلی لیتر محلول اسید اسکوربیک ۰/۱ مولار و ۵ میلی لیتر محلول پتاسیم آنتیموان تارتارات ۴/۴۷ مولار تهیه شد. سپس ۵ میلی لیتر از محلول رویی و نیز ۸ میلی لیتر از معرف مخلوط داخل بالن ریخته و با آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار فسفر حل شده از طریق محاسبه مقدار فسفر محلول در نمونه‌های مایه زنی شده با جدایه‌ها و شاهد (بدون مایه زنی) و تفریق این دو مقدار از یکدیگر به دست آمد.

تولید آنزیم فیتاز: برای تولید فیتاز نیاز به محیط کشت تخمیری است که بر طبق روش شیه و وار (۱۹۶۸) با کمی اصلاحات به‌کار گرفته شد. در روش اصلاح شده، دکسترین جایگزین نشاسته محلول شده و پتاسیم دی هیدروژن فسفات بعنوان منبع فسفر استفاده می‌شود. بنابراین محیط کشت تخمیری اصلاح شده در هر ۱۰۰ میلی لیتر شامل موارد ذیل می باشد:

۵ گرم دکسترین، ۲/۵ گرم گلوکز، ۰,۸۶ ۰/۸۶ گرم نیترات سدیم، ۰/۰۰۴ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۰۵ گرم پتاسیم کلراید، ۰/۰۵گرم سولفات منیزیم ۷ آبه و ۰,۰۱ گرم سولفات آهن ۷ آبه.

اسیدیته محلول نیز قبل از سترون سازی ۵,۵ می‌باشد.

پس از ساخت محیط کشت تخمیر، ۱۰۰ میلی‌لیتر لیتر از آن برداشته شد و به آن ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور (۵×۱۰۷ اسپور در هر لیتر) که از کشت گونه‌ها در دمای ۳۰°C بر روی محیط کشت PDA به مدت ۷ روز تهیه شده است و با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر (شامل ۰/۱ میلی لیتر بر لیتر توین ۸۰) شستشو داده شده،مایه زنی شد و به مدت ۱۵ روز در دمای اتاق، نگه‌داری شد. پس از تخمیر، محلول به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (g۱۰۰۰۰) شد که میسیلیوم ها جدا شوند و مایع شناور شفاف جمع‌آوری شد. به عصاره استخراج شده سولفات آمونیوم برای رسیدن به غلظت نهایی ۲۵ درصد اضافه شد و به مدت یک ساعت در حالت شیک انکوبه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (g۹۰۰۰) شد.رسوب خارج شد و آمونیوم سولفات به محلول رویی اضافه شد تا به غلظت ۷۵درصد برسد.محلول به مدت ۱۲ ساعت با شیک انکوبه شد وعصاره سلولی به مدت ۳۰ دقیقه

سانتریفیوژ(۹۰۰۰g) شدند و محلول رویی خارج و رسوب در ۵ میلی لیتر بافر TRIS-HCl (۲۵ میلی مولار، اسیدیته برابر با ۷/۲) حل شد و در همین بافر به مدت یک شب دیالیز شد.

سنجش فعالیت آنزیم فیتاز: برای سنجش فعالیت آنزیم تجزیه کننده فیتات از روش اصلاح شده هیوننو لاهتی (۱۹۸۱) استفاده خواهد شد. در این روش ۱۰ میلی‌لیتر از کشت سلولی سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۳۰ دقیقه) شد و سپس مایع رویی برای اندازه گیری فعالیت آنزیم فیتاز مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی اسپکتروفتومتری در حجم 2 میلی‌لیتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه و با استفاده از بافرهای TRIS-HCL (اسیدیته ۷/۴) و استات سدیم (اسیدیته ۵) شامل فیتات سدیم ۱۰ میلی‌مولار انجام شد. واکنش با افزودن ۱،۵ میلی‌لیتر از معرف استن، اسید سولفوریک 5 نرمال و آمونیوم مولیبدات ۱۰ میلی مولار (۲:۱:۱ حجمی/حجمی) متوقف شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسید سیتریک به آن اضافه گردید. فعالیت آنزیم تجزیه کننده فیتات در طول موج۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری فسفات آزاد شده، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت ۳۰-۵ میلی‌مولار فسفات تهیه گردید. یک واحد فعالیت آنزیم فیتاز مقدار آنزیمی است که موجب آزادسازی یک میکرومول فسفات آلی در دقیقه تحت شرایط آزمایشگاهی گردد.
در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری jump۱۱ در سطح معنی‌داری ۱ درصد آنالیز شده و مقایسه میانگین‌ها هم به روش LSD انجام شد.

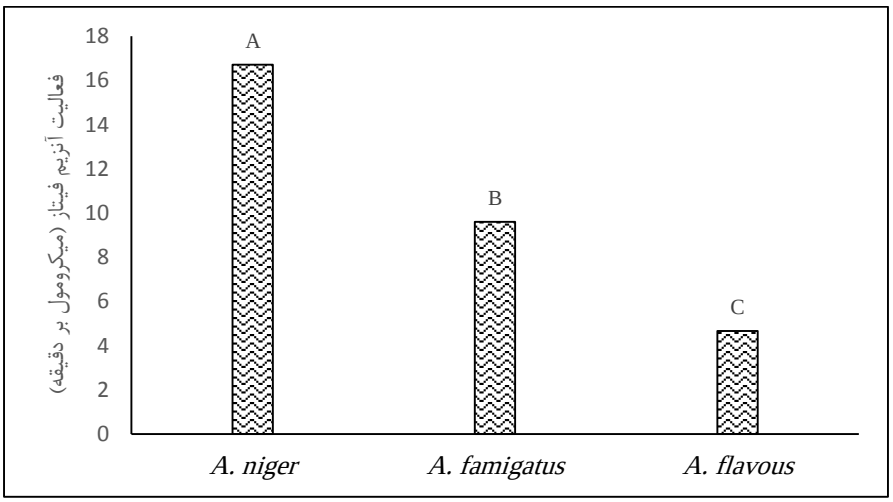
نتایج و بحث

تاثیر سه گونه قارچ آسپرژیلوس برا فعالیت آنزیم فیتاز و میزان حل شدن فسفر از منبع آلی در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جداول ۱ و ۲).
مقایسه بین سه گونه قارچ مورد آزمایش، نشان داد که میزان فعالیت آنزیم فیتاز در گونه *آسپرژیلوس نایجر* از دو گونه دیگر بیشتر بوده و مقدار آن ۱۶/۷ میکرومول در دقیقه بود. قارچ *آسپرژیلوس فامیگاتوس* نیز با دارا بودن مقدار فعالیت آنزیمی ۴/۶۶ میکرومول در دقیقه کمترین فعالیت آنزیمی را در بین سه گونه داشت. نتایج به دست آمده با نتایج که نشان داده شد که آسپرژیلوس نایجر بهترین تولید کننده آنزیم فیتاز می‌باشد بانتایج Shieh and War (۱۹۸۶) و Lee وهمکاران(۲۰۰۵) مطابقت داشت.
پارامتر دیگر اندازه‌گیری شده در این آزمایش میزان فسفر حل شده از منبع آلی فیتات سدیم بود. نتایج نشان داد که گونه *آسپرژیلوس نایجر* در حل کردن فسفر از منبع آلی فیتات سدیم نیز بهتر عمل کرده و میزان فسفر محلول در این تیمار نسبت به دو گونه دیگر به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۱$) بیش‌تر بود. کمترین میزان فسفر محلول مربوط به گونه *آسپرژیلوس فلاووس* بود.

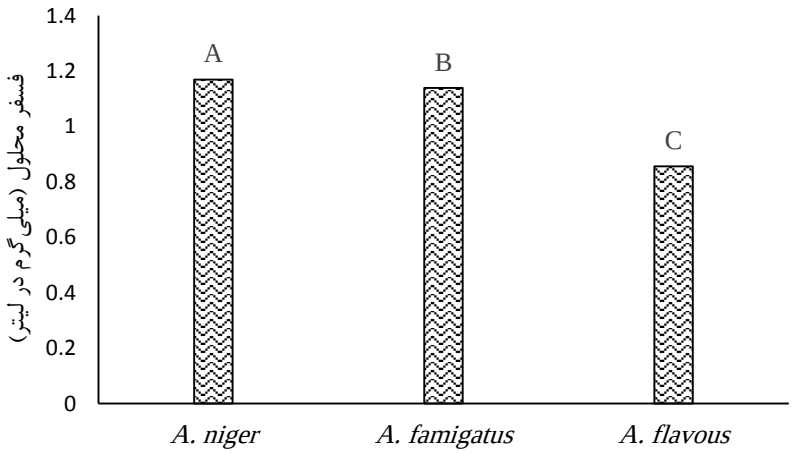
جداول ۱ و ۲- تجزیه واریانس تاثیر سه گونه قارچ آسپرژیلوس به ترتیب از چپ به راست بر فعالیت آنزیم فیتاز و فسفر محلول

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F ratio
مدل	۲	۲۱۹/۶۴	۱۰۹/۸۲	۱۴۱۱
خطا	۶	۰/۴۸	۰/۰۷۸	Probe >F
کل	۸	۲۲۰/۱۱		۰/۰۰۰۱ <

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F ratio
مدل	۲	۰/۱۷۸	۰/۰۸۹	۱۲۴۰
خطا	۶	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۷	Probe >F
کل	۸	۰/۱۷۸		۰/۰۰۰۱ <



شکل ۱- فعالیت آنزیم فیتاز در سه گونه قارچ آسپرژیلوس



شکل ۲- تاثیر سه گونه قارچی بر میزان فسفر محلول

خاک‌ها ممکن است حاوی مقادیر قابل توجهی فسفر آلی باشند و فسفاتازهای میکروبی می‌توانند نقش مهمی در معدنی کردن فسفر آلی خاک به عهده داشته باشند. فیتات‌ها از فراوانترین انواع فسفر آلی نامحلول موجود در خاک به شمار می آیند (Dalal, ۱۹۷۷). آنزیم فیتاز به طور متوالی فسفر را از فیتیک اسید آزاد می‌کند. Sonia Dahiya و همکاران (۲۰۰۹) جداسازی و بهینه‌سازی فاکتورهای رشد قارچ را انجام دادند. جداسازی میکروارگانیسم ها از خاهای حاوی کود، بقایای گیاهی و ریشه گیاهان غنی از فیتات انجام گرفت. بیش از ۱۱ نوع قارچ جداسازی شد که ۲ سویه از آن‌ها تولید کننده‌ی فیتاز خارج سلولی بودند. به‌طور کلی بر اساس نتایج این تحقیق از میان گونه‌های قارچی بررسی شده گونه *آسپرژیلوس نایجر* به‌عنوان تواناترین گونه قارچی با بیش‌ترین فعالیت آنزیم فیتاز شناسایی شد.

منابع

Abbott, L. K., and Robson, A. D. 1979. A quantitative study of the spores and anatomy of mycorrhizas formed by a species of Glomus, with reference to its taxonomy. Australian Journal of Botany, 27(4), 363-375.

Bunemann EK (2008). Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. Soil Biology and Biochemistry 40: 2116-2129.

Cao L, Wang W, Yang C, Yang Y, Diana J, Yakupitiyage A, Luo Z, Dapeng L (2007). Application of microbial phase in fish feed. Enzyme and Microbial Technology 40: 497-507.

Greiner R (2004). Purification and properties of a phytate-degrading enzyme from Panteoa agglomerans. Protein Journal 23: 567-576.

Greiner R, Konietzny U (2006). Phytase for Food Application. Food Technology and Biotechnology 44: 125–140.

Haefner S, Knietsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O (2005). Biotechnological production and applications of phytases. Applied Microbiology and Biotechnology 68: 588–597.

Kim OK, Lee JK, Kim HK, Yu JH, Oh TK (1998). Cloning of the thermostable phytase gen) phy). From Bacillus sp. DS11 and its overexpression in Escherichia coli. FEMS Microbiology Letter 162: 185–191.

Koide, R. T. 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. New phytologist, 117(3), 365-386.

Koide, R. T., and Kabir, Z. 2000. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus Glomus intraradices can hydrolyse organic phosphate. New Phytologist, 148(3), 511-517.

Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. science, 304(5677), 1623-1627.

Lei GX, Poress JM (2003). Phytase enzyology, applications, and biotechnology. Biotechnology Letters 25: 1787-1794.

Lei GX, Stahl CH (2001). Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Applied Microbiology and Biotechnology 57: 474- 481.

Mullaney EJ, Ullah A (2005). Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. In Proceedings of the Bouyoucos Conference: Inositol Phosphates in the Soil–Plant–Animal System, Sun Valley, Idaho, USA, 21–24 August 2005. Edited by B. L. Turner, A E. Richardson, and E. J. Mullaney. 17–18.

Nogueira, M.A., and Cardoso, E. J. B. N. 2007. Phosphorus availability changes the internal and external endomycorrhizal colonization and affects symbiotic effectivenes. Scientia Agricola, 64(3), 295-300.

Pawlowska, T.E., and Charvat, I. 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. Applied and environmental microbiology, 70(11), 6643- 6649.

Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK (1982). Phytates in legumes and cereals. In: Chichester, C. O., Mrak, E. M., and Stewart, G. F. (Eds.)., Advances in Food Chemistry, Academic Press, New York, 1–92.

Rillig, M. C., and Mummey, D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist, 171(1), 41-53.

Shieh TR, Ware JH (1968). Survey of microorganisms for the production of the production of extracellular phytase. Applied Microbiology 16: 1348-1351.

Shimizu M (1992). Purification and characterization of phytase from Bacillus subtilis (natto). N- 77. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 56: 1266–1269.

Sonia D , Namita S (2009).*Optimization of growth parameters of phytase producing fungus using RSM* . Department of Bio & Nano Technology

Suzuki U, Yoshimura K, Takaishi M (1907). Ueberein enzym phytase das anhydro-oxy-methilen diphosphorusaure spaltet. Bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University 7: 503–512.

Turner B.L., Frossard E. and Baldwin D.S. 2005. Organic Phosphorus in the Environment, CABI Publishing Series ,412 P.

Vohra A, Satyanarayana T (2003). Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. Critical Reviews in Biotechnology 23: 29-60.

Wright, S. F., and Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and soil, 198(1), 97-107.

Yadav, R. and J. Tarafdar (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(6): 745-751

Effect of produced phytase from fungal sources on the solubility of organic phosphorus

T. valizade Hajjar[1], A. lakzian[2], M. Mjidzade heravi [3], A. Hallaj nia [4]

Master student, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad

Professor, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad

Assistant Professor, Dept. of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad

Associate Professor, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

In this study qualitatively and quantitatively the phytase enzyme activity of fungal species were investigated.The results showed that three species of *Aspergillus* phytase activity and the amount of dissolved organic phosphorus source (01 / 0P≤) was significant. The activity of phytase in the three species of *Aspergillus*, *Aspergillus niger* species from other species and amount of 16.7 micromoles per minute. *Aspergillus flavus* also having the enzyme activity 4.66 micromoles per minute the lower enzyme activity of the three species. *Aspergillus niger* species in the solution of the organic source of phosphorus from phytate sodium and soluble phosphorus in the treated better than the other two species were significantly different (01 / 0P≤) found. The minimum amount of soluble phosphorus was related to *Aspergillus flavus.*

Keywords: *Aspergillus niger*, *Aspergillus Famigatus*, *Aspergillus flavus*, Organic Phosphorous, sodium phytate, phytase.