

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

تکتم جواهری¹، امیر لکزیان، رضا خراسانی و پریسا طاهری

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه 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.* (A₇, A₁₀, A₁₅, A₁₉) 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 اندازه‌گیری 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 A₁₅ 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 از محیط 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

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 منواسترهای 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 بستره‌های 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 مؤثرتر هستند (طرفدار و جانک، 1987). قارچ‌های حل کننده فسفات نسبت به باکتری‌ها برای آزاد کردن آنزیم‌های فسفاتاز در خاک و حل کردن فسفر خاک برتری دارند، زیرا ریشه‌های 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). آسپروژیلوس از جمله قارچ‌های حل کننده فسفات در ریزوسفر است که توانایی معدنی کردن فسفر آلی به معدنی را از طریق فرایند هیدرولیز دارد (فیتزترین 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 فسفونواسترازها و فسفودی

استرازها و فیتازها هستند. فسفونواسترازها بر روی منواسترهای فسفات عمل می‌کنند و بر اساس اپتیمم pH محیط به دو صورت فسفونواسترازهای اسیدی و قلیایی تقسیم می‌شوند. فسفونواسترازهای اسیدی در خاک‌های اسیدی و فسفونواسترازهای قلیایی در خاک‌های بازی و خشتی 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 منیزیم دار) و همچنین گلیسر 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). گلیسر فسفات سدیم یک ترکیب منو فسفات 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 پایاجیانی 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)

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.* (A₇, A₁₀, A₁₅, A₁₉) و سه جدایه از قارچ‌های (*Trichoderma harzianum* (Th)، همراه تیمار شاهد (فاقد قارچ) بودند. جدایه‌های *Rhizoctonia solani* (R) و *Penicillium spp.* (P) به همراه تیمار شاهد (فاقد قارچ) بودند. جدایه‌های اسپریلوس 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 آن 923/8 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 PDA¹ به مدت 5 روز رشد داده شدند و سپس دیسک‌هایی با قطر 8 میلی‌متری برای تلقیح به 50 میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB² 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 قارچ‌ها اندازه‌گیری شد.

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

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

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-II یک فیتاز می‌باشد. همچنین این آنزیم‌ها طی دوره‌های 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 فسفر بودند بیشتر از سایر ریز جانداران می‌باشد. طبق تحقیقات صورت گرفته، اسپریلوس‌ها در این رابطه بسیار حائز اهمیت هستند. بر این اساس، هدف این پژوهش بررسی فعالیت فسفاتازهای اسیدی و قلیایی جدایه‌های اسپریلوس استان خراسان رضوی و مقایسه با سه جدایه پنسیلیوم و رایزوکتونیا سولانی و تریکودرما هارزیانوم در حضور اسید فیتیک و گلیسرو فسفات سدیم در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

1. Potato Dextrose Agar

2. Potato Dextrose Broth

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 اسپکتروفوتومتر 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 گلیسروفسففات 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، آسپرژیلوس‌ها به ترتیب (A₇، A₁₀، A₁₅، A₁₉)، *Trichoderma harzianum* (Th)، *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، A₁₅ بیشترین و A₁₀ کمترین و در مقایسه کلی بین جدایه‌ها، Th¹ بیشترین و A₁₀ کمترین فعالیت فسفاتاز اسیدی را به همراه داشتند. در محیط حاوی اسید فیتیک، در میان قارچ‌های آسپرژیلوس، A₁₅ و A₁₉ بیشترین و A₇ و A₁₀ 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 میسلیومی می‌باشد و بیشترین فعالیت فسفاتاز اسیدی در قارچ‌های آسپرژیلوس، پنسیلیوم، فوزاریوم و نروسپورا مشاهده شده است. دلیل آن ممکن است، تفاوت داشتن جدایه‌ها از لحاظ ویژگی‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی باشد. قارچ‌ها موجوداتی متنوع‌اند و با هم اختلاف زیادی دارند. وجه مشترک آن‌ها نحوه تغذیه آن‌هاست که همه آن‌ها هتروتروف هستند.

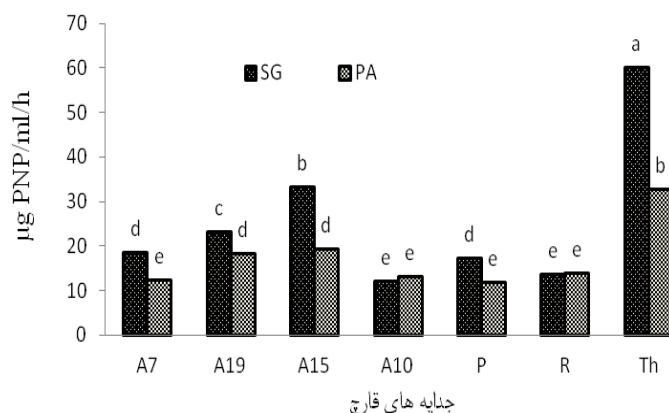
قارچ‌ها پس از ترشح آنزیم‌های هضم غذا، به کمک آن‌ها مواد غذایی محیط خود را شکسته و به صورت مواد ساده و محلول در آب در می‌آورند که مقداری از آن جذب سلول‌های آن‌ها می‌شود. قارچ‌ها در تماس با مولکول‌های آلی، آنزیم‌های هضم کننده را آزاد می‌کنند که سبب هیدرولیز آن‌ها می‌شود که از این لحاظ با هم اختلاف دارند (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 آن‌ها 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 A₁₀ و R² 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 (فیتترین و همکاران، 2008).

². *Rhizoctonia solani*

¹. *Trichoderma harzianum*

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.

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*، *Aspergillus niger*، *Pseudomonas mallei subtilis* در محیط کشت حاوی اسید فیتیک در مقایسه با گلیسرو فسفات سدیم، فنیل فسفات، دی‌گلوکوز فسفات بیشتر است که این با نتایج مطالعه حاضر تناقض دارد. علت این تناقض شاید به دلیل نوع اسید



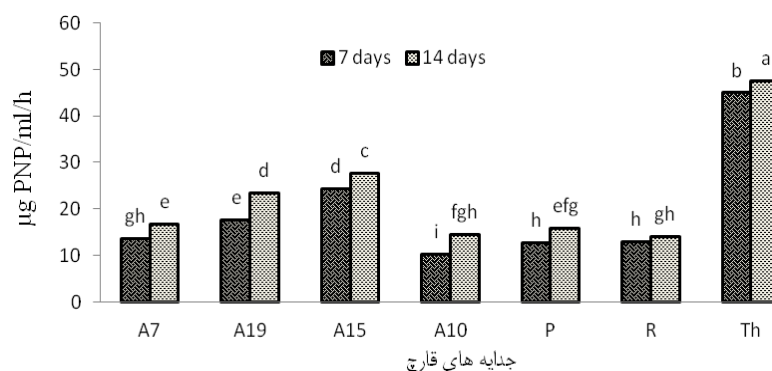
شکل 1- تأثیر ترکیبات آلی فسفر و جدایه‌های قارچ بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی

البته در جدایه A19 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 جدایه‌ها رشد سریعتری دارند و فعالیت آنزیمی نیز بیشتر است (یاداو و طرفدار، 2003). آسری و همکاران (2009) طی بررسی که بر تأثیر 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

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 14 روز اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/05$). در روز هفتم در میان جدایه‌های آسپرژیلوس، A15 بیشترین و A10 کمترین فعالیت آنزیمی و در مقایسه کلی بین جدایه‌ها، Th بیشترین و A10 کمترین فعالیت را در محیط کشت نشان داده‌اند. در روز چهاردهم در میان جدایه‌های آسپرژیلوس، A15، بیشترین و A10 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 14 روز فعالیت فسفاتاز اسیدی اکثریت جدایه‌ها افزایش یافت. در طی بررسی تغییرات فعالیت فسفاتاز اسیدی از 7 تا 14 روز مشاهده شد که افزایش فعالیت آنزیمی در اکثریت جدایه‌ها تقریباً به یک نسبت است

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.

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 قارچ‌ها 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 پنسیلیوم) فعالیت آنزیمی با گذشت زمان افزایش پیدا کرد. اما این محقق طی تحقیقی که بر فسفاتاز باکتری‌ها انجام داد،



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

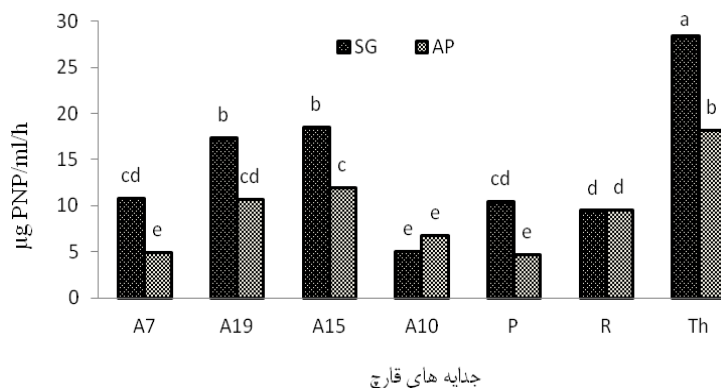
را به همراه داشتند. آسری و همکاران (2009) طی مقایسه‌ای که بین گونه‌های *Aspergillus Penicillium*، *Trichoderma sp* و *Pseudeurotium zonatum* در رابطه با فعالیت فسفاتاز قلیایی انجام دادند، بیان کردند که قارچ *Trichoderma Sp* بیشترین فعالیت فسفاتاز قلیایی را دارد. در میان گونه‌های آسپرژیلوس بیشترین فعالیت مربوط به گونه *Aspergillus parasiticus* بود. طی تحقیقی که توسط یاداو و طرفدار (2003)، بر گونه‌های مختلف آسپرژیلوس، پنسیلیوم، 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 ماکزیم فعالیت فسفاتاز قلیایی در جدایه‌های امرسیلا و از میان آن‌ها گونه *Emmericella rugulosa* وجود دارد. جدایه‌های پنسیلیوم 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

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 نیز گلیسروفسفات سدیم به صورت SG و اسید فیتیک 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، آسپرژیلوس‌ها به ترتیب (A7، A10، A15، A19)، *Trichoderma harzianum* (Th)، *Rhizoctonia solani* (R) و *Penicillium spp.* (P) نمایش داده شده‌اند. در محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم، بین اکثریت جدایه‌ها از لحاظ فسفاتاز قلیایی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). در میان جدایه‌های آسپرژیلوس، A15 و A19 بیشترین و A10 کمترین و در بین کلیه جدایه‌ها، Th بیشترین و A10 کمترین فعالیت فسفاتاز قلیایی را نشان دادند.

در محیط حاوی اسید فیتیک، در میان جدایه‌های آسپرژیلوس، A15 و A19 بیشترین و A7 و A10 کمترین و در مقایسه کلی جدایه‌ها، Th بیشترین فعالیت فسفاتاز قلیایی

طرفدار، 2003). الکسیوا و همکاران (2003) عنوان کردند که عوامل مختلفی در آزاد سازی آنزیم اثر دارد از جمله pH محیط 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 متابولیک‌ها از جمله آنزیم‌ها اثر می‌گذارد که این بسته به نوع و غلظت بستره دارد).

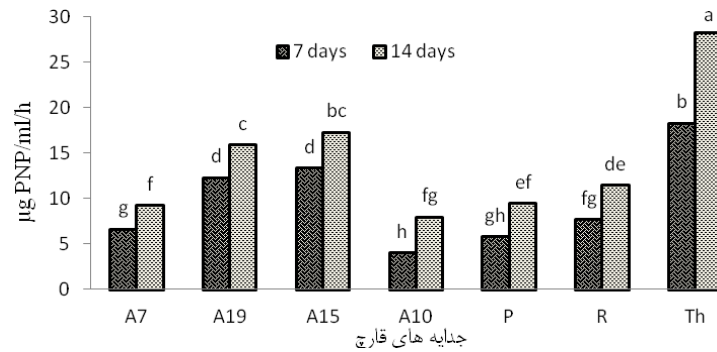
است. به غیر از جدایه‌های A₁₀ و R که اختلاف معنی‌داری در فعالیت فسفاتاز قلیایی در دو محیط کشت نداشتند. پس نوع ترکیب آلی بر فعالیت فسفاتاز قلیایی قارچ‌ها نیز اثر دارد. رشد قارچ‌های محیط حاوی گلیسرو فسفات سدیم بهتر از محیط حاوی اسید فیتیک بود و حتی اسپوردهی قارچ‌ها نیز سریعتر بود. شاید دلیل دیگر آن pH پایین‌تری 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



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

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 جدایه‌های *آسپرژیلوس*، جدایه A₁₉ و A₁₅ 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.

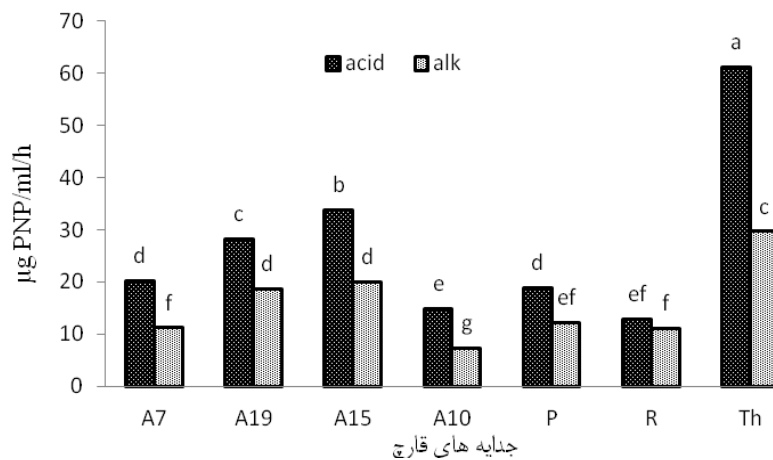
در شکل 4 تأثیر زمان بر فعالیت فسفاتاز قلیایی جدایه‌های قارچ مشاهده شده است. اختلاف معنی‌داری بین فعالیت فسفاتاز قلیایی جدایه‌ها طی دو زمان مشاهده می‌شود. در روز هفتم، در بین جدایه‌های *آسپرژیلوس*، A₁₅ و A₁₉ بیشترین و A₁₀ کمترین و در مقایسه کلی بین جدایه‌ها، Th بیشترین و A₁₀ کمترین فعالیت آنزیمی را در محیط کشت نشان داده است. در روز چهاردهم، بین جدایه‌های *آسپرژیلوس*، A₁₉ و A₁₅ بیشترین و A₁₀ و A₇ کمترین و در مقایسه کلی جدایه‌ها، Th بیشترین و A₁₀ 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



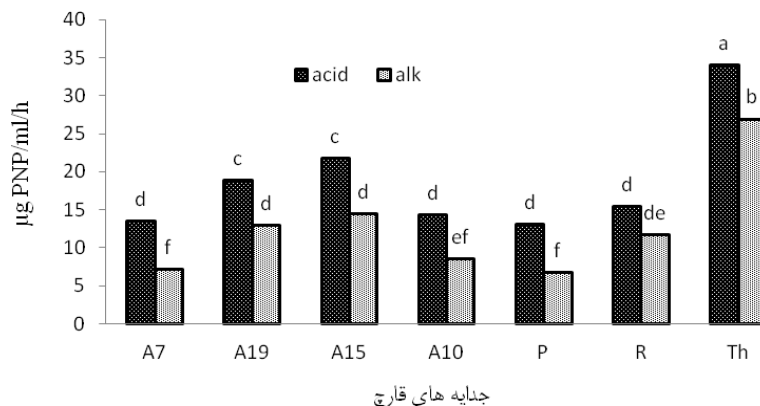
شکل 4- تأثیر زمان و جدایه‌های قارچ بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

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 پانندی 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.

در شکل 5 و 6 فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی (acid) و قلیایی (alk) در دو محیط کشت مقایسه شده است. در محیط حاوی گلیسر و 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



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



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

فسفاتاز اسیدی و قلیایی را نشان داد. نوع ترکیبات آلی فسفردار نیز بر فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌های قارچ تأثیر گذاشته است. فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی جدایه‌های محیط کشت گلیسرو فسفات سدیم بیشتر از 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.

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* (A₁₅) مشاهده شد. در مقایسه بین کلیه جدایه‌ها، محیط کشت *Trichoderma harzianum* (Th) بیشترین فعالیت

جدول آنالیز واریانس فسفاتاز اسیدی

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

جدول آنالیز واریانس فسفاتاز قلیایی

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
2	Factor A	6	2652.747	442.125	142.8166	0.0000
4	Factor B	1	429.703	429.703	138.8041	0.0000
6	AB	6	110.574	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			

فهرست منابع:

1. 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 a handle 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 from sake koji mold, *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 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 Microbiology* 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 *Biofidobacterium*. *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 Phosphorous.
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 Biotechnology* 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. Sapatarka, 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.

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. *Applied and Environmental Microbiology* 65:267-373.

