جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
مجله پژوهش‌های حفاظت آب و خاک
جلد بیستم، شماره دوم، ۱۳۹۲
http://jwsc.gau.ac.ir

ارزیابی فراوانی اکتینومایست‌ها و جداسازی اکتینومایست‌های تجزیه‌کننده فیتات در اکوسیستم‌های خاکی مختلف

*رضا قربانی‌نصرآبادی[۱]، حسینعلی علیخانی[۲]، جواد حامدی[۳]، باقر یخچالی[۴] و رالف گرینر[۵]
[۱]استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه تهران، [۳]دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، [۴]دانشیار گروه میکروبیولوژی محیطی و صنعتی، پژوهشگاه ملی بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک، تهران، [۵]گروه فن‌آوری مواد غذایی و مهندسی فرآیند زیستی، مؤسسه ماکس روبنر، مؤسسه تحقیقات فدرال تغذیه و مواد غذایی، کارلزروهه، آلمان

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۲

چکیده

اکتینومایست‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها وجود داشته و در فرآیندهای مهمی دخالت دارند. بنابراین بررسی چگونگی توزیع آن‌ها در درک نقش اکولوژیک آن‌ها اهمیت بسیاری دارد. تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های خاک (از جمله اکتینومایست‌ها) قادرند اشکال مختلف فسفر آلی و معدنی نامحلول را به فرم محلول و قابل استفاده گیاه تبدیل نمایند. هدف از این پژوهش، بررسی فراوانی جمعیت اکتینومایست‌ها و جداسازی، غربال‌گری و ارزیابی فعالیت تجزیه‌کنندگی فیتات سدیم به‌وسیله این گروه از میکروارگانیسم‌ها با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) بود. به این منظور ۹۷ نمونه خاک از زیست‌بوم‌های خاکی مختلف استان گلستان جمع‌آوری گردید. از محیط‌های گلیسرول آرژینین آگار اصلاح شده (MGAA)، برای جداسازی اکتینومایست‌های متداول و MGA-SE اصلاح شده (MMGA-SE) برای جداسازی اکتینومایست‌های کمیاب تجزیه‌کننده فیتات استفاده شد. شمارش اکتینومایست‌ها نیز در محیط GAA انجام گرفت. تعداد اکتینومایست‌ها در کاربری‌های مختلف تفاوت معنی‌داری ($P<0/001$) با یکدیگر داشتند و اقلیم بر برخی خصوصیات خاک و جمعیت اکتینومایست‌ها مؤثر بود. بیش‌ترین تعداد اکتینومایست‌ها متعلق به اراضی زراعی آبی و کم‌ترین تعداد متعلق به اراضی مرتعی بود. ۴۶/۳ درصد از

*مسئول مکاتبه: rgnasr@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدایه‌های مورد بررسی توانستند فسفر محلول را در محیط مایع آزاد نمایند. جدایه‌های منتخب دارای توانمندی تجزیه فیتات بوده و این فعالیت به‌شدت متأثر از ترکیب محیط کشت بود. مقدار نسبی تجزیه اینوزیتول هگزافسفات در جدایه‌های مختلف تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر داشتند به‌طوری‌که میزان تجزیه سوبسترا در محدوده ۹۵/۲-۱/٦٥ درصد قرار داشت.

واژه‌های کلیدی: اکتینومایست، آنزیم تجزیه‌کننده فیتات، فسفر، کاربری اراضی

مقدمه

اکتینومایست‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها وجود داشته و در فرآیندهای مهمی دخالت دارند (امبلی و استکبرانت، ۱۹۹٤). این باکتری‌ها در تجزیه مواد آلی (از جمله لیگنین و سایر پلیمرهای سخت تجزیه‌شونده) در خاک مؤثر بوده و می‌توانند ضایعات کشاورزی و صنعتی را تجزیه نمایند (کرافورد، ۱۹۸۸؛ مک‌کارتی و همکاران، ۱۹۸۷). متابولیت‌های به‌دست آمده از اکتینومایست‌ها مهم‌ترین منبع تولید فرآورده‌های بیوتکنولوژیک بوده و حدود ۸۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌ها توسط این میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود. همچنین این باکتری‌ها منبع مهمی برای تولید آنزیم‌ها و فرآورده‌های فعال زیستی دیگر به‌شمار می‌روند (بول و همکاران، ۱۹۹۲؛ گودفیلو، ۱۹۸۸). هم‌اکنون اکتینوباکتری‌ها یکی از شاخه‌های اصلی در دومین باکتری‌ها می‌باشند. رده اکتینوباکتری‌ها شامل ۵ زیررده، ۹ راسته، ۵۵ خانواده، ۲٤۰ جنس و ۳۰۰۰ گونه می‌باشد.

بررسی چگونگی توزیع اکتینومایست‌ها در محیط در درک نقش اکولوژیک آن‌ها اهمیت بسیاری دارد. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده که گرچه ساختار جمعیت باکتریایی خاک تحت‌تأثیر پوشش گیاهی است اما خصوصیات خاک نقش مهم‌تری در این رابطه دارند (بوسیو و همکاران، ۲۰۰۵؛ گیروان و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج بررسی تغییرات جمعیت میکروبی در اراضی زراعی، مرتعی و جنگلی نشان داد که اکتینوباکترها در مراتع و اراضی کشاورزی متداول‌ترند (لوبر و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین با مقایسه جمعیت‌های باکتریایی اراضی جنگلی، مرتعی و نیشکر در هاوایی، برزیل و اکوادور مشخص شد که اکتینومایست‌ها در خاک‌های اراضی کشاورزی جزو بزرگ‌تری از جمعیت میکروبی را نسبت به اراضی جنگلی تشکیل می‌دهند (برک و همکاران، ۲۰۰۳). با توجه به بررسی‌های انجام گرفته به‌نظر می‌رسد پراکنش اکتینوباکترها با جمعیت باکتریایی کل که به‌وسیله خصوصیات خاک مثل pH

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

(فیرر و همکاران، ۲۰۰۹) و بافت (جلسومینو و همکاران، ۱۹۹۹) کنترل می‌شود، متفاوت بوده و مشابه قارچ‌ها است که با تبدیل اراضی جنگلی به کشاورزی افزایش می‌یابد (برک و همکاران، ۲۰۰۳؛ والدراپ و همکاران، ۲۰۰۰).

فسفر عنصری ضروری برای همه موجودات زنده است و این عنصر در اکوسیستم خاک، بیش‌تر محدودکننده رشد گیاهان می‌باشد. بهبود مدیریت چرخه فسفر به‌دلیل محدودیت ذخایر قابل استخراج آن ضروری به‌نظر می‌رسد. فسفر خاک می‌تواند به دو فرم آلی و معدنی وجود داشته باشد. در بسیاری از خاک‌ها مقدار به‌نسبت زیادی فسفر وجود دارد که در صورت قابل استفاده بودن، بیش از نیاز میکروارگانیسم‌های خاک و گیاهان است. ولی بخش اعظم فسفر خاک به‌صورتی است که به‌طور مستقیم قابل استفاده نیست. فسفر آلی معمولاً ٦٥-۲۹ درصد از فسفر کل خاک را تشکیل می‌دهد و میزان آن در برخی از خاک‌های آلی تا ۹۰ درصد نیز می‌رسد (هریسون، ۱۹۸۷).

اشکال فسفر در فاز معدنی، فرآیندهای فیزیکوشیمیایی جذب و واجذب و اثرات آن‌ها بر چرخه و قابلیت استفاده فسفر به‌خوبی شناخته شده و قابل پیش‌بینی است ولی اشکال آلی فسفر به‌طور کامل شناخته نشده و فرآیندهای زیستی (مثل معدنی شدن و آلی شدن) دینامیک فسفر را به مقدار متفاوت و بیش‌تر نامشخص، متأثر می‌سازند. همچنین اثرات متقابل دینامیک فسفر با کربن و نیتروژن نیز به‌خوبی شناخته نشده است. فراهمی فسفر معدنی در خاک به‌طور عمده به‌وسیله خصوصیات انحلال کانی‌های شامل فسفر (که به‌طور عمده به‌وسیله pH تعیین می‌شود) و نیز واکنش‌های تعادل محلول (جذب و واجذب) کنترل می‌گردد. در حالی‌که فراهمی فسفر به‌دست آمده از فسفر آلی به‌طور عمده تحت کنترل فعالیت میکروبی (معدنی شدن و هیدرولیز آنزیمی) می‌باشد. همانند گیاهان عالی، میکروارگانیسم‌ها این پتانسیل را دارند که محیط شیمیایی پیرامونی نزدیک خود را از طریق جذب و آزادسازی یون‌ها و مولکول‌های آلی و معدنی اصلاح نمایند (جونز و ابرگر، ۲۰۱۱).

مهم‌ترین ترکیبات فسفره آلی در خاک اینوزیتول فسفات‌ها، فسفولیپیدها و نوکلئیک اسیدها هستند (کوی‌کوامپویکس و موسین، ۲۰۰۵؛ ترنر و همکاران، ۲۰۰۲). فراوانی اینوزیتول‌فسفات‌ها در خاک بسیار متفاوت است. هر چند که آن‌ها معمولاً شکل غالب فسفر آلی خاک (با بیش از ۸۰ درصد فسفر آلی) را تشکیل می‌دهند (دلال، ۱۹۷۷). این ترکیبات شامل یک توالی از مونواسترهای فسفات، از اینوزیتول مونوفسفات تا اینوزیتول هگزاکیس فسفات بوده و به‌صورت استرئوایزومرهای مختلف (*myo*، *scyllo*، *neo* و *D-chiro*) دیده می‌شوند (سلی و باربریز، ۲۰۰۵).

تولید کشاورزی هنوز به کاربرد کود فسفره به‌دست آمده از سنگ فسفات بسیار وابسته است. به‌دلیل افزایش تقاضا و کاهش تدریجی منابع، پیش‌بینی می‌شود که احتمالاً ذخایر کنونی سنگ فسفات در طی ۱۰۰-۵۰ سال به پایان برسد (کوردل و همکاران، ۲۰۰۹). به‌علاوه، روند رو به رشد کشاورزی منجر به اشباع هم‌زمان تعداد زیادی از اکوسیستم‌ها با نیتروژن و فسفر شده است که نتیجه آن تخریب منابع خاکی، آبی و دریایی می‌باشد (تیلمن و همکاران، ۲۰۰۱). این نگرانی نیاز مبرم به درک بهتر از چرخه فسفر گیاه- خاک- میکروب را با هدف کاهش اتکاء به کودهای معدنی، کاملاً مشخص نموده و منجر به افزایش توجه نسبت به، به‌کارگیری میکروارگانیسم‌ها برای بهبود چرخه فسفر در اکوسیستم‌های کشاورزی شده است. پتانسیل برخی از میکروارگانیسم‌ها در افزایش قابل‌توجه چرخه فسفر آلی و معدنی (برای مثال از طریق انحلال منابع فسفره آلی و معدنی نامحلول) به‌خوبی شناخته شده است.

با توجه به آن‌که بخش قابل‌توجهی از فسفر کل خاک به فرم آلی می‌باشد، نقش میکروارگانیسم‌ها در تغییر و تبدیل فسفر را نباید فراموش نمود. به‌علاوه، میکروب‌ها همانند گیاهان به‌طور فعال یا غیرفعال پروتون‌ها، دی‌اکسیدکربن و متابولیت‌های آلی ثانویه (مثل قندها، آنیون‌های اسید آلی، اسیدهای آلی،آنزیم‌ها، فنل‌ها) را آزاد می‌کنند که ممکن است همه آن‌ها در انحلال فسفر از مواد معدنی خاک مشارکت داشته باشند. در این میان توانایی انحلال فسفر به‌وسیله اکتینومایست‌ها در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود معطوف نموده است (بارتو و همکاران، ۲۰۰۸؛ ال- ترابیلی و همکاران، ۲۰۰۸)، هر چند که پژوهش‌های یاد شده بر روی توانایی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول معطوف بوده است، زیرا این گروه از میکروارگانیسم‌ها نه تنها قادرند در محیط‌های دارای شرایط نهایی (خشکی، شوری و...) زنده بمانند بلکه برتری‌های بالقوه دیگری (از جمله تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات شبه‌هورمون‌های گیاهی و...) را دارند که می‌توانند به‌طور هم‌زمان برای رشد گیاه مفید باشد (همدالی و همکاران، ۲۰۰۸). در سال‌های اخیر در کشور فعالیت‌هایی در مورد جداسازی اکتینومایست‌های بومی ایران انجام شده و گونه‌های جدید مانند *Streptomyces iranensis*، *Nocardiopsis sinupersici* و *N. arvandica* از خاک‌های کشور جدا شده است (حامدی و همکاران، ۲۰۱۰؛ حامدی و همکاران، ۲۰۱۱). ولی در همه این پژوهش‌ها توانمندی این باکتری‌ها از نظر فعالیت تولید آنتی‌بیوتیک مدنظر بوده و تاکنون پژوهشی در مورد نقش اکتینومایست‌های مفید در چرخه فسفر در ایران گزارش نشده است. همچنین بنا به اطلاعات ما تا زمان انتشار این مقاله، پژوهشی با هدف جداسازی و غربال‌گری اکتینومایست‌های تجزیه‌کننده فیتات انجام نشده است. نظر

به لزوم استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی در کاربردهای کشاورزی، در این پژوهش، علاوه‌بر اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک در زیست‌بوم‌های خاکی مختلف استان گلستان و شمارش جمعیت اکتینومایست‌ها، جداسازی اکتینومایست‌های تجزیه‌کننده فیتات از توده خاک (خاک غیرریزوسفری) نیز انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های خاک: ۹۷ نمونه خاک از عمق ۱۵-۰ سانتی‌متری زیست‌بوم‌های مختلف استان گلستان شامل خاک‌های جنگلی، اراضی مرتعی، اراضی کشاورزی دیم و آبی با رعایت اصول نمونه‌برداری میکروبی، جمع‌آوری گردید.

تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک: پس از انتقال نمونه‌های خاک به آزمایشگاه، همه نمونه‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت هوا خشک گردیده و پس از کوبیدن از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. بافت خاک به روش هیدرومتری (بویکوس، ۱۹٦۲) تعیین گردید. اسیدیته خاک در گل اشباع و با استفاده از دستگاه pH متر و قابلیت هدایت الکتریکی با استفاده از هدایت‌سنج الکتریکی در عصاره اشباع اندازه‌گیری شد (پیج و همکاران، ۱۹۸۷). کربن آلی با اکسیداسیون توسط دی‌کرومات پتاسیم اندازه‌گیری شد (نلسون و سامرز، ۱۹۸۲).

جداسازی اکتینومایست‌های حل‌کننده فیتات: برای جداسازی اکتینومایست‌های حل‌کننده فیتات، از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از اکوسیستم‌های خاکی مختلف سری رقت تهیه گردید و بر روی محیط‌های MGAA (ال- نکیب و لچه والیر، ۱۹٦۳)، PSM (محیط غربال‌گری فیتاز) (کروویو و همکاران، ۱۹۹۸) و ISP2 (پریدهام و همکاران، ۱۹۵۷) اصلاح شده (MISP2) تلقیح گردید. برای جداسازی اکتینومایست‌های کمیاب حل‌کننده فیتات نیز از محیط MMGA-SE (نانومورا و اوهارا، ۱۹۷۱) استفاده گردید (جدول ۱). برای جداسازی اکتینومایست‌های متداول از تیمار هواخشک (۷۲ ساعت) و حرارت خشک (دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱٦ ساعت) (ویلیامز و ولینگتون، ۱۹۸۲) و اکتینومایست‌های کمیاب از تیمار هوا خشک و حرارت خشک (دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه) استفاده گردید (نانومورا و اوهارا، ۱۹۷۱). پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱٤ روز (برای اکتینومایست‌های متداول) و ۳۰ روز (برای اکتینومایست‌های کمیاب) گرماگذاری شد. کلنی‌هایی که از نظر مورفولوژیکی مشابه اکتینومایست‌ها و دارای هاله شفاف در اطراف کلنی بودند به‌عنوان حل‌کنندگان فیتات در نظر گرفته و پس از خالص‌سازی بر محیط ISP2 نگهداری شدند.

جدول ۱- محیط‌های جداسازی اکتینومایست‌های تجزیه‌کننده فیتات در این پژوهش (گرم بر لیتر).

PSM		MGAA		MISP2		MGA-SE	
Sodium Phytate	٤	Arginine-HCl	۱	Malt extract	۱۰	Glucose	۲
Glucose	۲۰	Glycerol	۱۲/۵	Yeast extract	٤	Soil extract	۲۰۰
$CaCl_۲$	۲	Sodium Phytate	٤	Sodium Phytate	۲	L-Asparagine	۱
$NH_٤NO_۳$	۵	$CaCl_۲$	۱	Glucose	٤	Sodium Phytate	٤
KCl	۰/۵	NaCl	۱	$CaCO_۳$	۲	$MgSO_٤ . ۷H_۲O$	۰/۵
$MgSO_٤ . ۷H_۲O$	۰/۵	$MgSO_٤ . ۷H_۲O$	۰/۵	Agar	۱۵	$FeSO_٤ . ۷H_۲O$	۰/۰۱
$FeSO_٤ . ۷H_۲O$	۰/۰۱	$FeSO_٤ . ٦H_۲O$	۰/۰۱	pH	۷/٤	$CuSO_٤ . ۵H_۲O$	۰/۰۰۱
$MgSO_٤ . H_۲O$	۰/۰۱	$CuSO_٤ . ۵H_۲O$	۰/۰۰۱			$MgSO_٤ . ۷H_۲O$	۰/۰۰۱
Agar	۱۵	$MgSO_٤ . H_۲O$	۰/۰۰۱			$ZnSO_٤ . ۷H_۲O$	۰/۰۰۱
pH	۷	$ZnSO_٤ . ۷H_۲O$	۰/۰۰۱			Agar	۲۰
		Agar	۱۵			pH	۷/٤
		pH	۷				

شمارش جمعیت اکتینومایست‌های متداول: برای شمارش تعداد اکتینومایست‌های متداول، پس از انجام پیش‌تیمار دمایی ذکر شده در بالا، نمونه‌ها در ۳ محیط، نوترینت آگار، گلیسرول آرژینین آگار (GAA) (ال- نکیب و لچه‌والیر، ۱۹٦۳) و ISP2 (پریدهام و همکاران، ۱۹۵۷) به همراه دی‌کرومات پتاسیم ۱ درصد (w/v) (به‌میزان ۰/۲ درصد (v/v) یا سیکلوهگزیمید به‌میزان ۱۰۰ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد.

سوسپانسیون خاک بر روی محیط GAA، به‌مدت ۲ هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پیش‌تیمار دمایی (دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱٦ ساعت) به‌عنوان بازدارنده رشد سایر میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گرفت. کلنی‌های با ظاهر خشک، شکننده و پودری به‌عنوان اکتینومایست در نظر گرفته شد و تعداد آن‌ها شمارش گردید.

سنجش میزان فسفر آزاد شده در محیط گلیسرول آرژینین مایع: پس از ۵ روز گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کشت‌ها سانتریفیوژشدند (۷۰۰۰ گرم به‌مدت ۱۰ دقیقه) و ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی عبور داده شده از کاغذ واتمن ٤۲ برای اندازه‌گیری فسفر استفاده شد. فسفر محلول در نمونه‌ها با استفاده از روش (مرفی و رایلی، ۱۹٦۲) و به روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری گردید. در این روش ابتدا معرف مخلوط، شامل ۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۲/۵ مولار، ۱۵ میلی‌لیتر محلول مولیبدات

آمونیوم (۰/۰۳۲ مولار)، ۳۰ میلی‌لیتر محلول اسید اسکوربیک (۰/۱ مولار) و ۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم آنتیموان تارتارات (٤/٤٧ میلی‌مولار) تهیه گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی و نیز ۸ میلی‌لیتر از معرف مخلوط داخل بالن ریخته و با آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. مقدار فسفر حل شده از طریق محاسبه مقدار فسفر محلول در نمونه‌های تلقیح شده با جدایه‌ها و شاهد (بدون تلقیح) و تفریق این دو مقدار از یکدیگر به‌دست آمد.

سنجش فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده فیتات: برای سنجش فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده فیتات از دو روش مختلف استفاده شد:

الف- روش اصلاح شده هینونن و لاهتی (۱۹۸۱): در این روش ۱۰ میلی‌لیتر از کشت سلولی سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰rpm در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳۰ دقیقه) شده و سپس مایع رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده فیتات مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی اسپکتروفتومتری در حجم ۲ میلی‌لیتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه و با استفاده از بافرهای (pH ۷/٤) Tris-HCl و استات سدیم (pH ۵) شامل فیتات سدیم ۱۰ میلی‌مولار انجام شد. واکنش با افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف استن، اسید سولفوریک ۵ نرمال و آمونیوم مولیبدات ۱۰ میلی‌مولار (۲:۱:۱ حجمی/ حجمی) متوقف شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسید سیتریک به آن اضافه گردید. فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده فیتات در طول موج ۳۵۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری فسفات آزاد شده، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت ٦۰۰-۵ میلی‌مولار فسفات تهیه گردید. یک واحد فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده فیتات، مقدار آنزیمی است که موجب آزادسازی یک میکرومول فسفات معدنی در دقیقه تحت شرایط آزمایشی گردد.

ب- آنالیز تجزیه اینوزیتول هگزافسفات به‌وسیله روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC): این ارزیابی براساس روش Association of Official Analytical Chemists 1990 Method No. 986.11 (AOAC) صورت گرفت. برای کمی کردن مقادیر مشتقات مختلف تجزیه اینوزیتول هگزافسفات، کروماتوگرافی زوج یون با استفاده از Ultrasep ES 100 RP18 (۲۵۰×۲ میلی‌متر) (سندبرگ و آدرین، ۱۹۸٦) انجام و به‌منظور اسیدی نمودن محیط از اسید کلریدریک استفاده شد. ۲ میلی‌لیتر از محیط رقیق شده را (به نسبت ۱:۲۵) به ستون (۱۵×۰/۷ سانتی‌متر) شامل رزین AG1-X8, 100-200 mesh اضافه نمودیم. در مرحله بعد، ستون با ۲۵ میلی‌لیتر آب و ۲۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲۵ میلی‌مولار شسته شد. سپس

میواینوزیتول فسفات با ۲۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ مولار رقیق گردید. به‌منظور تغلیظ محلول به‌دست آمده، از تبخیرکننده خلاء برای خشک کردن آن استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر برای حل کردن بقایا اضافه و ۲۰ میکرولیتر از نمونه به‌دست آمده با استفاده از Ultrasep ES 100 RP18 (۲۵۰×۲ میلی‌متر) کروماتوگرافی شد. ستون در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از ۰/۲ میلی‌لیتر در دقیقه شوینده شامل فورمیک اسید: متانول: آب: تترابوتیل آمونیوم هیدروکسید (٤٤:٥٦:٥:١/٥ حجمی/ حجمی)، ٤/٢٥ pH (سندبرگ و آدرین، ١٩٨٦) راه‌اندازی گردید. مخلوطی از استرهای میواینوزیتول فسفات (IP3-IP6) به‌عنوان استاندارد استفاده شد.

تجزیه آماری: کاربری اراضی و اقلیم به‌عنوان مؤلفه‌های اصلی مؤثر بر جمعیت اکتینومایست‌ها و محیط در نظر گرفته شد. برای بررسی روابط بین تعداد اکتینومایست‌ها، خصوصیات خاک، کاربری اراضی و اقلیم و نیز مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن، نرم‌افزار SAS مورد استفاده قرار گرفت.

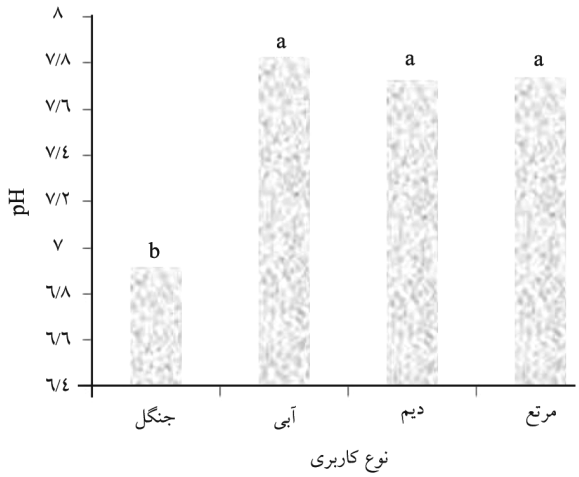
نتایج و بحث

کاربری اراضی، خصوصیات خاک و رابطه بین خصوصیات خاک و تعداد اکتینومایست‌ها: نتایج سنجش‌های فیزیکی، شیمیایی و شمارش تعداد اکتینومایست‌های خاک نشان داد که کربن آلی، pH، EC، بافت خاک (درصد رس و شن) و جمعیت اکتینومایست‌های متداول خاک در کاربری‌های مختلف تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۱) داشتند. همچنین، در اقلیم‌های مختلف در همه فاکتورهای بالا به‌جز تعداد اکتینومایست‌ها (P<۰/۰۵) در سطح ۱ درصد (P>۰/۰۱) تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بیش‌ترین مقدار کربن آلی خاک در اراضی جنگلی و بیش از ٤، ٥ و ١١ برابر اراضی زراعی آبی، دیم و مرتعی بود. کم‌ترین مقدار pH خاک مربوط به اراضی جنگلی، کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار EC به‌ترتیب در اراضی زراعی دیم و مرتعی اندازه‌گیری شد. تعداد اکتینومایست‌های متداول در خاک‌های زراعی آبی بیش از سایر کاربری‌ها شمارش گردید و همچنین بیش‌ترین تعداد اکتینومایست‌های متداول مربوط به اقلیم نیمه‌خشک، بیش‌ترین pH در اقلیم خشک، بیش‌ترین EC در اقلیم نیمه‌خشک و بیش‌ترین مقدار کربن آلی در اقلیم مرطوب قرار داشت.

در این پژوهش فقط در اراضی مرتعی بین کربن آلی و تعداد اکتینومایست‌ها همبستگی مثبت (r=۰/۵۳، n=۱۵ و P<۰/۰۱) وجود داشت. همچنین EC (r= -۰/٦۰، n=۱۵ و P<۰/۰۰۱) و pH

(r= −۰/۵۹، n=۱۵ و P<۰/۰۰۱) دارای همبستگی منفی با تعداد اکتینومایست‌ها بودند ولی در سایر کاربری‌ها همبستگی بین فاکتورهای یاد شده و تعداد اکتینومایست‌ها مشاهده نشد. همبستگی نداشتن بین فاکتورهای خاک و تعداد اکتینومایست‌ها با یافته‌های کیست و تونکیا (۱۹۸۳) مطابقت داشت.

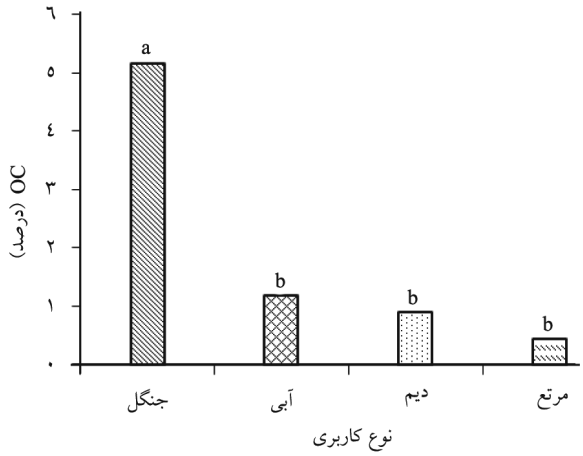
مقایسه میانگین واکنش خاک در اکوسیستم‌های مختلف: بررسی خاک کاربری‌های مختلف نشان داد که pH خاک در کاربری جنگل با اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۱) کم‌تر از سایر کاربری‌ها بود. میانگین pH خاک از ٦/٩٢ در کاربری جنگل به ٧/٨٦ در اراضی زراعی آبی افزایش یافته است (شکل ۱). نتایج به‌دست آمده با یافته‌های اسلام و ویل (۲۰۰۰) مطابقت دارد. به‌نظر می‌رسد در خاک‌های جنگلی یون‌های بازی شسته شده و بنابراین pH خاک کم‌تر از سایر نقاط است. فرآیندهای طبیعی مانند دی‌اکسیدکربن آزاد شده بر اثر تنفس ریشه گیاهان و تنفس میکروبی خاک را می‌توان به‌عنوان عوامل کنترل‌کننده pH خاک در نظر گرفت. بنا به نظر لوبر و همکاران (۲۰۰۸) تفاوت در pH ممکن است ناشی از چندین فاکتور از جمله نوع پوشش گیاهی، نوع خاک و نوع مدیریت بوده و بنابراین pH ممکن است به‌عنوان یک متغیر مناسب، بیانگر خصوصیات فیزیکوشیمیایی یک خاک باشد. همچنین نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که بین واکنش خاک و تعداد اکتینومایست‌ها همبستگی وجود ندارد.



*** در شکل حروف مشابه در سطح ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند**

شکل ۱- مقایسه میانگین مقادیر pH در کاربری‌های مختلف.

مقایسه میانگین کربن آلی خاک در اکوسیستم‌های مختلف: مقادیر میانگین کربن آلی خاک در نمونه‌های به‌دست آمده از کاربری‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود میزان کربن آلی خاک از میانگین ۵/۱۷ درصد در اراضی جنگلی به ۱/۱۷ درصد در اراضی زراعی آبی تنزل یافته است. نتایج به‌دست آمده با یافته‌های پوگت و لال (۲۰۰۵) مطابقت دارد. بنا به نظر ناردی و همکاران (۱۹۹٦) خاک‌دانه‌های درشت در مناطق تحت کشت به‌دلیل عملیات شخم شکسته شده و مواد آلی خاک از حفاظت فیزیکی کم‌تری برخوردارند. به‌نظر می‌رسد این مسأله موجب اکسیداسیون سریع‌تر مواد آلی و کاهش مقدار آن در اراضی تحت کشت شده باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که بین کربن آلی خاک و تعداد اکتینومایست‌ها فقط در اراضی مرتعی همبستگی مثبت ولی غیرمعنی‌داری (r= ۰/۵۳، n=۱۵ و P>۰/۱) وجود داشت.

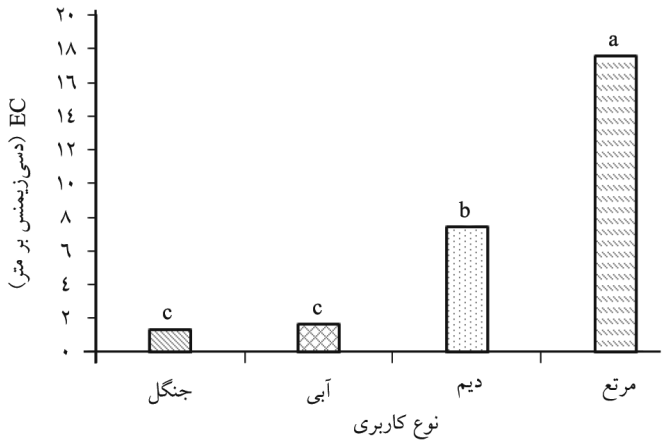


*** در شکل حروف مشابه در سطح ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند**

شکل ۲- مقایسه میانگین مقادیر کربن آلی در کاربری‌های مختلف.

مقایسه میانگین شوری خاک در اکوسیستم‌های مختلف: در شکل ۳ میانگین مقادیر شوری خاک در کاربری‌های مختلف نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود بیش‌ترین شوری خاک در اراضی مرتعی و کم‌ترین آن در اراضی زراعی آبی و جنگلی بوده که تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۰۱) با یکدیگر داشتند. بین شوری خاک و تعداد اکتینومایست‌ها فقط در اراضی مرتعی همبستگی منفی مشاهده شد.

مقادیر بیش از حد نمک‌ها منجر به طیفی از اثرات نامطلوب بر روی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و فرآیندهای بیولوژیک می‌گردد (کرن، ۲۰۰۰؛ لیانگ و همکاران، ۲۰۰۳) تخریب ناشی از شوری در خاک‌های اقلیم خشک با مقادیر اندک کربن آلی خاک مشخص می‌شود. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که کم‌ترین مقادیر کربن آلی در اراضی مرتعی بوده که به‌طور عمده در اقلیم خشک قرار داشتند (شکل ۲). شوری زیاد اثر منفی قابل‌ملاحظه‌ای بر میکروارگانیسم‌های خاک دارد (یوان و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج کنونی نیز نشان می‌دهد که کم‌ترین تعداد اکتینومایست‌ها در اراضی مرتعی بوده که این اراضی دارای بیش‌ترین شوری در بین کاربری‌های مختلف است.



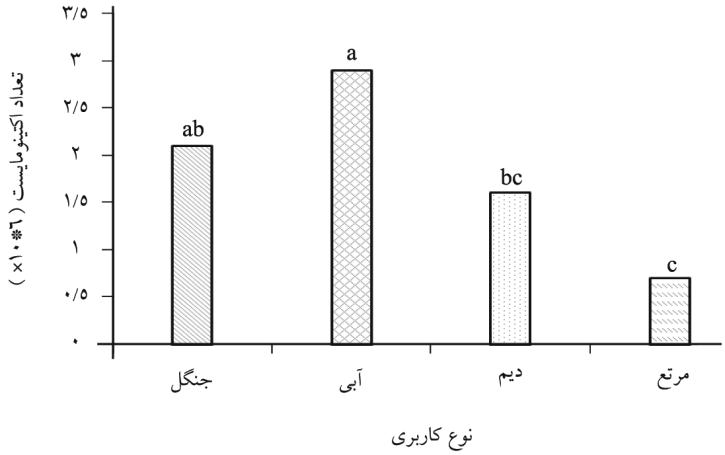
*** در شکل حروف مشابه در سطح ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند**

شکل ۳- مقایسه میانگین مقادیر شوری خاک در کاربری‌های مختلف.

تغییر جمعیت اکتینومایست‌ها در کاربری‌های مختلف: تعداد اکتینومایست‌ها در خاک کاربری‌های مختلف در محیط GAA در شکل ٤ نشان داده شده است. در بین خاک‌های مطالعه شده کم‌ترین تعداد انواع متداول اکتینومایست‌ها در هر گرم خاک خشک اراضی مرتعی (۷×۱۰^{۵}) و بیش‌ترین آن در اراضی زراعی آبی ($۲/۸٦\times۱۰^{٦}$) شمارش گردید. همچنین در اراضی جنگلی میانگین تعداد اکتینومایست‌ها تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با یکدیگر داشتند (شکل ۵).

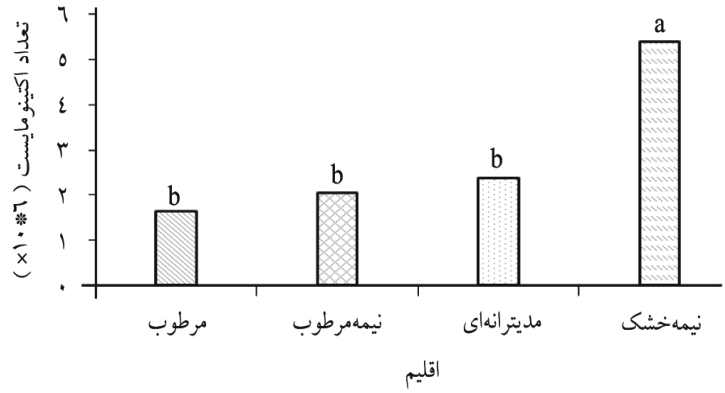
بیش‌ترین تعداد اکتینومایست‌ها دراقلیم نیمه‌خشک و کم‌ترین تعداد آن‌ها در اقلیم مرطوب شمارش گردید. اکتینومایست‌ها به اندازه سایر باکتری‌ها تحت‌تأثیر شرایط نیمه‌خشک قرار نمی‌گیرند و سطوح به‌نسبت پایین رطوبتی را ترجیح می‌دهند. به‌طورکلی با خشک شدن خاک، واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی اکتینومایست‌ها بالا باقی می‌مانند در حالی‌که میزان نسبی سایر باکتری‌ها به‌دلیل نبود تحمل به شرایط خشکی به‌طور منفی تحت‌تأثیر قرار می‌گیرند (الکساندر، ۱۹۷۷). میزان بالای اکتینومایست‌ها در خاک‌های خشک همچنین ممکن است به‌دلیل توان اسپورزایی تحت این شرایط باشد که می‌تواند مرگ جمعیت‌های میسلیومی این باکتری‌ها را جبران نموده و سبب حفظ تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی اکتینومایست‌ها بر روی محیط‌های جداسازی شود (ال- ترابیلی و سیواسیتامپارام، ۲۰۰٦).

اکتینومایست‌های حل‌کننده فیتات: با مقایسه نتایج به‌دست آمده محیط گلیسرول آرژینین آگار برای بررسی نهایی انتخاب شد. علاوه بر آنکه میزان جداسازی اکتینو- مایست‌های تجزیه‌کننده فیتات (براساس شاخص ایجاد هاله شفاف) در محیط PSM و ISP2 پایین بود، محیط ISP2 به‌میزان زیادی دچار آلودگی قارچی شد. برای جداسازی تجزیه‌کننده‌های فیتات از پیش‌تیمارهای دمایی استفاده شد. از جمله مشکلات اصلی جداسازی اکتینومایست‌ها، لزوم جلوگیری از رشد باکتری‌های تند رشد و قارچ‌ها است. این میکروارگانیسم‌ها به‌خوبی بر روی محیط‌های متداول مورد استفاده برای جداسازی اکتینومایست‌ها رشد می‌نمایند. در پژوهش‌های مختلف از تیمارهای آنتی‌بیوتیکی ضدقارچ و ضدباکتری به این منظور استفاده شده است. ولی این‌کار می‌تواند موجب کاهش تعداد جدایه‌های اکتینومایست از نمونه‌ها شود به همین دلیل با توجه به حساسیت بیش‌تر باکتری‌ها و قارچ‌ها به دمای بالا، از پیش‌تیمار حرارتی در فرآیند غربال‌گری و جداسازی استفاده شد. این روش در سایر پژوهش‌ها از جمله ولینگتون و توت (۱۹۹٤) نیز مورد استفاده قرار گرفته است. در مورد اکتینومایست‌های کمیاب هیچ جدایه دارای توانایی ایجاد هاله بر روی محیط اصلاح شده MGA-SE دارای فیتات سدیم جداسازی نشد. به همین دلیل ابتدا اکتینومایست‌های کمیاب بر روی محیط MGA-SE جداسازی و سپس بررسی فعالیت تجزیه‌کنندگی فیتات در آن‌ها بر روی GAA اصلاح شده دارای فیتات سدیم انجام گرفت و به این ترتیب از نمونه‌های خاک، تعداد ۹۰ جدایه دارای هاله خالص‌سازی شد.



*** در شکل حروف مشابه در سطح ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند**

شکل ٤- مقایسه میانگین فراوانی اکتینومایست‌ها در کاربری‌های مختلف.



*** در شکل حروف مشابه در سطح ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند**

شکل ۵- مقایسه میانگین فراوانی اکتینومایست‌ها در اقلیم‌های مختلف کاربری جنگل.

از اکوسیستم‌های خاکی مختلف ۹۰ اکتینومایست دارای توانایی ایجاد هاله بر روی محیط گلیسرول آرژینین آگار، جداسازی گردید. به‌دلیل آن‌که برخی از جدایه‌های به‌دست آمده از یک خاک دارای شباهت مورفولوژیک بودند، از بین آن‌ها جدایه‌ای که دارای نسبت قطر هاله به قطر کلنی بیش‌تری بود

انتخاب گردید. بنابراین در نهایت توانایی حل فسفر آلی در مورد ٦٧ جدایه در محیط مایع انجام شد. از جدایه‌های منتخب برای بررسی در محیط مایع، ۲۹، ۳٦ و ۳۵ درصد به‌ترتیب به اراضی آبی، دیم و جنگلی تعلق داشتند. نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده در اقلیم‌های مختلفی قرار داشتند. پراکنش جدایه‌های حل‌کننده فیتات در محیط جامد نیز متفاوت بود به‌طوری‌که ۱۷، ٤٦/۲۵، ۲۵/۳، ۱/۳ و ۱۰/۱۵ درصد جدایه‌ها به‌ترتیب از اقلیم مرطوب، نیمه‌مرطوب، نیمه‌خشک، خشک و مدیترانه‌ای جداسازی گردید.

میزان فسفر آزاد شده در محیط مایع به‌وسیله جدایه‌های مختلف: از بین ٦٧ جدایه منتخب، ۳ جدایه توانایی رشد در محیط پیش کشت را نداشتند (۲ جدایه متعلق به اراضی جنگلی و ۱ جدایه متعلق به اراضی دیم). همچنین ٤ جدایه (۳ جدایه از اراضی دیم و ۱ جدایه از اراضی زراعی آبی) نیز در محیط پیش‌کشت رشد به‌نسبت کمی داشته و پس از انتقال به محیط تخمیر نیز رشد مناسبی نداشتند. بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار فسفر محلول آزاد شده به‌وسیله جدایه‌های به‌دست آمده از اراضی جنگلی به‌ترتیب ۲/٤۳۷ و ۰/۱، اراضی دیم ۱/۹۰۱۳۳۸ و ۰/۰۱۳۷۸۲۸ و در اراضی آبی ۰/٥٤۲۲٥٦ و ۰/۰۳۱۲ میلی‌گرم در لیتر بود. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۱$) بین مقادیر فسفر آزاد شده در محیط مایع وجود دارد. بیش‌ترین مقدار فسفر محلول آزاد شده مربوط به جدایه ۷۳ (جداسازی شده از اراضی جنگلی) و کم‌ترین آن متعلق به جدایه ۳۱ (جدا شده از اراضی دیم) بود. نتایج نشان داد که ٤٦/۲۷ درصد از جدایه‌های مورد بررسی توانستند فسفر محلول در محیط مایع آزاد نمایند. نتایج مربوط به میزان فسفر آزاد شده در محیط مایع در جدول ۲ نشان داده شده است.

بررسی توانایی تولید آنزیم فیتاز با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و HPLC: در بررسی‌های اولیه صورت گرفته با روش اسپکتروفتومتری در محیط MGAA با روش هینونن و لاهتی (۱۹۸۱) هیچ‌یک از جدایه‌های مورد بررسی توانایی تولید آنزیم را از خود نشان ندادند، به‌رغم آن‌که همه جدایه‌ها به‌خوبی در محیط یاد شده رشد نموده و فیتات سدیم به‌عنوان تنها منبع فسفر در این محیط وجود داشت. بنابراین تمامی جدایه‌ها از نظر توان تجزیه فیتات مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده از HPLC نشان داد که ۱۲ جدایه مورد آزمایش دارای توان تجزیه اینوزیتول هگزا فسفات بوده ولی مقدار تجزیه آن در جدایه‌های مختلف تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر داشت. توانایی جدایه‌های مختلف در هیدرولیز اینوزیتول هگزافسفات و تولید سایر مشتقات دفسفریله (اینوزیتول پنتا تا اینوزیتول تری‌فسفات) در طی

۱۰ روز رشد در محیط MGA با استفاده از HPLC اندازه‌گیری شد. مقدار نسبی تجزیه اینوزیتول هگزافسفات در جدایه‌های مختلف تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر داشتند و در محدوده ۹۵/۲-۱/۶۵ درصد قرار داشت بر این اساس جدایه‌ها به ۳ گروه متفاوت تقسیم‌بندی شدند. گروه اول، جدایه‌هایی که بیش از ۶۰ درصد اینوزیتول هگزافسفات را تجزیه نمودند شامل جدایه‌های ۳۹، ۴۳، ۴۵ و ۶۳. گروه دوم، جدایه‌هایی که کم‌تر از ۵۰ درصد و بیش از ۳۸ درصد اینوزیتول هگرافسفات را تجزیه نمودند شامل جدایه‌های ۴۷، ۴۸، ۵۰ و ۵۱. و گروه سوم که مقادیر بسیار ناچیزی از اینوزیتول هگزافسفات را تجزیه نمودند شامل ۴۴، ۴۶، ۶۸ و ۷۲.

جدول ۲- میزان فسفر آزاد شده (میلی‌گرم پاسکال بر لیتر) در محیط مایع به‌وسیله جدایه‌های مختلف.

میلی‌گرم پاسکال بر لیتر	شماره جدایه	میلی‌گرم پاسکال بر لیتر	شماره جدایه	میلی‌گرم پاسکال بر لیتر	شماره جدایه
۱/۴۵۳^{c}	۵۱	۰/۰۱۳۷^{m}	۳۱	۰/۲۹۶^{ijk}	۴
۰/۱۱۲^{lm}	۶۱	۰/۱۳۱۲^{m}	۳۶	۱/۹۰۱^{b}	۵
۰/۰۷۴^{lm}	۶۲	۰/۴۱۱^{hi}	۳۹	۰/۱۲۴^{lm}	۱۲
۰/۴۳۵^{hi}	۶۳	۱/۰۴۵^{ef}	۴۲	۰/۵۴^{h}	۱۴
۰/۹۳۴^{f}	۶۶	۱/۱۱۶^{de}	۴۳	۰/۱۶۴^{lm}	۱۵
۱/۹۴^{b}	۶۷	۱/۰۰۰۷^{ef}	۴۴	۰/۲۱۱^{jkl}	۱۶
۰/۱۶۸^{klm}	۶۸	۱/۴۷۴^{c}	۴۵	۰/۲۱۲^{jkl}	۲۰
۱/۳۶۶^{c}	۷۲	۱/۱۰۶^{de}	۴۶	۰/۳۷^{ij}	۲۳
۲/۴۳۷^{a}	۷۳	۰/۹۸۴^{ef}	۴۷	۰/۷۶۹^{g}	۲۴
		۱/۰۹۳^{def}	۴۸	۰/۱۴^{lm}	۲۶
		۱/۲۰۹^{d}	۵۰	۰/۲۹۹^{ijk}	۳۰

حروف مشابه نشان‌دهنده نبود تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) می‌باشد.

نتیجه‌گیری

بیش‌تر گونه‌های اکتینومایست به‌دلیل آن‌که شرایط سخت و ویژه‌ای را برای رشد نیاز ندارند در طبیعت گسترش زیادی دارند و جزو مهمی از اکوسیستم خاک بوده که سازگاری های مورفولوژیک و فیزیولوژیک پیچیده‌ای را ایجاد کرده‌اند که قادرند در محیط خاک رشد نمایند (ویلیامز و ولینگتون،

۱۹۸۲). اکتینومایست‌ها می‌توانند تعداد بسیار متنوعی از ترکیبات آلی (از جمله پکتین، لیگنین، کیتین، کراتین، لاتکس، ترکیبات آروماتیک و...) را تجزیه کنند. با این وجود پژوهش‌های چندانی در مورد پتانسیل این گروه از میکروارگانیسم‌ها در تجزیه اینوزیتول فسفات‌ها که یک جزو اصلی از فسفر آلی خاک است صورت نگرفته است. گرچه انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌های توانمند در تجزیه فیتات شامل مخمرها، قارچ‌ها، باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از محیط‌های متنوع خاکی و آبی جداسازی شده‌اند ولی تنوع ذاتی در میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده فیتات و فیتازهایی که تولید می‌نمایند نشان می‌دهد که انواع دیگری از میکروارگانیسم‌ها و فیتازها هنوز شناسایی نشده‌اند.

بنابر اطلاعات ما تاکنون گزارشی در مورد توان‌مندی اکتینومایست‌های خاک در تجزیه اینوزیتول فسفات‌ها به چاپ نرسیده است و به‌طور عمده توان تولید آنتی‌بیوتیک و تعدادی گزارش نیز در مورد توانایی انحلال فسفات‌های معدنی در آن‌ها وجود دارد. به همین دلیل اکتینومایست‌ها به‌عنوان گروهی ناشناخته از نظر توان‌مندی در تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده فیتات برای انجام این پژوهش برگزیده شدند. نتایج ما نشان داد که این گروه از میکروارگانیسم‌ها توان تولید آنزیم فیتاز را دارا می‌باشند.

منابع

1. Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology, 2nd ed. Krieger Publishing Company, Malabar, FL.
2. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Phytate in foods, anion-exchange method, No. 986.11. In Official Methods of Analysis, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Pp: 800-801.
3. Barreto, T.R., Da Silva, A.C.M., Soares, A.C.F., and De Souza, J.T. 2008. Population densities and genetic diversity of Actinomycetes associated to the rhizosphere of Theobroma cacao. Braz. J. Microbiol. 39: 464-470.
4. Bouyoucos, G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. Agron. J. 54: 464-465.
5. Bossio, D.A., Girvan, M.S., Verchot, L., Bullimore, J., Borelli, T., Albrecht, A., Scow, K.M., Ball, A.S., Pretty, J.N., and Osborn, A.M. 2005. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. Microb. Ecol. 49: 50-62.
6. Burke, R.A., Molina, M., Cox, J.E., Osher, L.J., and Piccolo, M.C. 2003. Stable carbon isotope ratio and composition of microbial fatty acids in tropical soils. J. Environ. Qual. 32: 198-206.
7. Bull, A.T., Goodfellow, M., and Slater, J.H. 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. Annu. Rev. Microbiol. 46: 219-252.

8.Celi, L., and Barberis, E. 2005. Abiotic stabilization of organic phosphorus in the environment, P 113-132. In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (eds.) Organic phosphorus in the environment. CABI, Wallingford.
9.Cordell, D., Drangert, J.O., and White, S. 2009. The story of phosphorus: global food security and food for thought. Glob. Environ. Change, 19: 292-305.
10.Crawford, D.L. 1988. Biodegradation of agricultural and urban wastes, P 433-439. In: Goodfellow M. Williams Stand Mordarski M. (ed.), Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.
11.Dalal, R.C. 1977. Soil organic phosphorus. Adv. Agron. 29: 83-117.
12.El-Nakeeb, M.A., and Leachevalier, H.A. 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. 11: 75-77.
13.El-Tarabily, K.A., and Sivasithamparam, K. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biol. Biochem. 38: 1505-1520.
14.El-Tarabily, K.A., Nassar, A.H., and Sivasithamparam, K. 2008. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a alcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of Micromonospora endolithica. Appl. Soil Ecol. 39: 161-171.
15.Embley, T.M., and Stackebrandt, E. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 48: 257-289.
16.Fierer, N., Carney, K.M., Horner-Devine, M.C., and Megonigal, J.P. 2009. The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. Microb. Ecol. 58: 435-445.
17.Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A.C., Cacco, G., and Van Elsas, J.D. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gel electrophoresis. J. Microbiol. Methods, 38: 1-15.
18.Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., and Ball, A.S. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1800-1809.
19.Goodfellow, M., Williams, S.T., and Mordarski, M. (ed.) 1988. Actinomycetes in biotechnology. Academic Press Ltd. London, United Kingdom.
20.Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M.J., and Ouhdouch, Y. 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. Appl. Soil Ecol. 38: 12-19.
21.Hamdei, J., Mohammadipanah, F., Klenk, H.P., Potter, G., Schumann, P., Sproer, C., Von Jan, M., and Kroppenstedt, R.M. 2010. *Streptomyces iranensis* sp. nov., isolated from soil. Int. J. System. Evol. Microbiol. 60: 150. 4-9.
22.Hamdei, J., Mohammadipanah, F., Potter, G., Sproer, C., Schumann, P., Goker, M., and Klenk, H.P. 2011. *Nocardiopsis sinuspersici* sp. Nov., isolated from sandy rhizospheric soil. Int. J. System. Evol. Microbiol. 60: 2346-52.
23.Harrison, A.F. 1987. Soil organic phosphorus: a review of world literature. CABI, Wallingford.

24.Heinonen, J.K., and Lahti, R.J. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. Anal. Biochem. 113: 313-317.
25.Islam, K.R., and Weil, R.R. 2000. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. Agriculture, Ecosystems and Environment, 79: 9-16.
26.Jones, D.L., and Oburger, E. 2011. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms, P 169-198. In: Bu¨nemann E.K., Oberson, A. and Frossard, E. (Eds) Phosphorus in action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
27.Keast, D., and Tonkia, C. 1983. Antifungal activity of Western Australian soil actinomycetes against *Phytopthora* and *Pythium* species and a mycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*. Aust. J. Biol. Sci. 36: 191-203.
28.Keren, R. 2000. Salinity, P 3-25. In: Sumner, M.E. (Ed.), Handbook of Soil Science. CRC Press, Boca Raton.
29.Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkinnen, N., and Apajalahti, J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2079-2085.
30.Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. 2009. Pyrosequencingbased assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. Appl. Environ. Microbiol. 75: 5111-5120.
31.Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., and Fierer, N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungalcommunities across land-use types. Soil Biol. Biochem. 40: 2407-2415.
32.Liang, Y.C., Yang, Y.F., Yang, C.G., Shen, Q.Q., Zhou, J.M., and Yang, L.Z. 2003. Soil enzymatic activity and growth of rice and barley as influenced by organic matter in an anthropogenic soil. Geoderma, 115: 149-160.
33.Mc Carthy, A.J. 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. FEMS Microbiol. Rev. 46: 145-163.
34.Murphy, J., and Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta, 27: 31-36.
35.Nardi, S., Cocheri, G., and Dell Agnola, G. 1996. Biological activity of humus, P 361-406. In: Piccolo, A. (Ed.), Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Elsevier, Amsterdam.
36.Nelson, D.W., and Sommers, L.E. 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter, P 539-579. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), Methods of Soil Analysis, Part 2.Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed.
37.Nonomura, H., and Ohara, Y. 1971. Distribution of actinomycetes in soil. X. New genus and species of monosporic actinomycetes in soil. J. fermentation technology, 49: 895-903.

38.Page, M.C., Sparks, D.L., Noll, M.R., and Hendricks, G.J. 1987. Kinetics and mechanisms of potassium release from sandy Middle Atlantic Coastal Plain soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 1460-1465.
39.Pridham, T.G., Anderson, P., Foley, C., Lindenfelser, L.A., Hessetine, C.W., and Benedict, R.G. 1957. A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomyces. Antibiotics Ann. Pp: 947-953.
40.Puget, P., and Lal, R. 2005. Soil organic carbon and nitrogen in a Mollisol in central Ohio as affected by tillage and land use. Soil & Tillage Research, 80: 201-213.
41.Quiquampoix, H., and Mousain, D. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus, P 89-112. In: Turner, B.L., Frossard, E., Baldwin, D.S. (Eds.) Organic phosphorus in the environment. CABI, Wallingford.
42.Sandberg, A.S., and Ahderinne, R. 1986. HPLC method for determination of inositol tri, tetra, penta, hexaphosphates in foods and intestinal contents. J. Food Sci. 51: 547-550.
43.Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., and Swackhamer, D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. Science, 292: 281-284.
44.Turner, B.L., Mc Kelvie, I.D., and Haygarth, P.M. 2002. Characterisation of water-extractable soil organic phosphorus by phosphatase hydrolysis. Soil Biol. Biochem. 34: 27-35.
45.Waldrop, M.P., Balser, T.C., and Firestone, M.K. 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. Soil Biol. Biochem. 32: 1837-1846.
46.Wellington, E.M.H., and Toth, I.K. 1994. Actinomycetes. p. 269-290 In: Methods of Soil Analysis. SSSA Book Series (No. 5.), Weaver, R.W., Angle, S., Bottomley, P., Bezdicek, S., Smith, S., Tabatabai, A. and Wollum, A. eds. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
47.Williams, S.T., and Wellington, E.M.H. 1982. Actinomycetes, P 969-987. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keency, O.R. (Eds.), Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbiological properties, second ed. American Society of Agronomy/ Soil Science Society of America, Madison.
48.Yuan, B.C., Li, Z.Z., Liu, H., Gao, M., and Zhang, Y.Y. 2007. Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. Appl. soil ecol. 35: 319-328.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Water and Soil Conservation, Vol. 20(2), 2013
http://jwsc.gau.ac.ir

Evaluation of actinomycetes abundance and isolation of phytate degrading actinomycetes in different soil ecosystems

***R. Ghorbani-Nasrabadi[1], H.A. Alikhani[2], J. Hamedi[3], B. Yakhchali[4] and R. Greiner[5]**

[1]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Soil Science, University of Tehran, [3]Associate Prof., Dept. of Microbiology, University of Tehran, [4]Associate Prof., Dept. of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, [5]Dept. of Food Technology and Bioprocess Engineering, Max Rubner-Institute, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Karlsruhe, Germany
Received: 04/25/2012; Accepted: 08/23/2012

Abstract

Actinomycetes are widely distributed in different habitats and involved in important processes. Therefore, evaluation of their distribution is important in understanding their ecological role. Many soil microorganisms (including actinomycetes) are able to transform different forms of insoluble organic and inorganic phosphorus into a soluble form suitable for plant uptake. The objective of this study was enumeration of common actinomycetes and determination of their phytate degradation by spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods. Ninty seven soil samples were collected from different soil ecosystems from the province of Golestan, Iran. The initial screening was made on modified glycerol arginin agar (MGAA) to isolate common actinomycetes and modified MGA-SE (MMGA-SE) for rare actinomycetes. The enumeration of common actinomycetes was achieved on GAA. Actinomycetes colony formed on GAA in different land use was significantly different ($P<0.001$) and climate variation affected some soil factors and actinomycetes number. Irrigated cultivated and pasture soils had maximum and minimum number of actinomycetes, respectively. The phosphate release was confirmed in liquid culture for 46.3% of the isolates. The selected isolates showed phytate-degrading activity and their capabilities was strongly dependent on media composition. A huge variation in the capacity to degrade phytate (1.65-95.2%) among different isolates was observed.

Keywords: Actinomycetes, Phytate degrading enzyme, Phosphorus, Land use

---

* Corresponding Author; Email: rgnasr@yahoo.com