

تأثیر افزودن رس مونت موریلونیت و رس آلی بر فعالیت آنزیم اوره آز و ال-آسپاراژیناز در خاک

محبوبه ابوالحسنی زراعتکار^۱، امیر لکزبان^{۲*}، امیر فتوت^۳، رضا خراسانی^۴

۱. دانشجوی دکتری، بیولوژی خاک گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. استاد، بیولوژی خاک گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳. دانشیار، بیولوژی خاک گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۴. دانشیار، بیولوژی خاک گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۸ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۵/۳/۲۱ - تاریخ تصویب: ۹۶/۲/۲۴)

چکیده

آنزیم‌های آمیدوهیدرولاز نقش بسیار مؤثری در حفظ محیط‌زیست و کشاورزی پایدار دارند. زیرا در واکنش‌های بیوشیمیایی مانند تجزیه مواد آلی، چرخه عناصر غذایی و تجزیه آلاینده‌ها نقش مهمی دارند. بنابراین حفظ فعالیت و پایداری آنزیم‌ها در خاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بدین منظور به بررسی افزودن رس مونت موریلونیت و رس آلی بر فعالیت و پایداری این آنزیم‌ها در خاک پرداخته شد. در این مطالعه رس آلی از اصلاح رس مونت موریلونیت سدیم‌دار با سورفکتانت کاتیونی هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید ساخته شد. جهت بررسی خصوصیات ساختاری و مورفولوژی رس آلی مونت موریلونیت سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدانی (FESEM) و ظرفیت تبادل کاتیونی رس استفاده شد. تأثیر رس آلی، رس مونت موریلونیت و مدت‌زمان انکوباسیون بر فعالیت آنزیم‌های اوره آز و ال-آسپاراژیناز در خاک مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز آماری تأثیر تیمار نوع رس و مدت‌زمان انکوباسیون بر فعالیت هر دو آنزیم در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد. میزان فعالیت هر دو آنزیم در نمونه خاک تیمار شده با رس آلی (۷۱/۴۸ و ۹/۰۱ میکروگرم آمونیوم آزاد شده به ازای یک گرم خاک پس از دو ساعت انکوباسیون به ترتیب در آنزیم اوره آز و ال-آسپاراژیناز) به‌طور چشمگیری بالاتر از نمونه شاهد (۲۹/۱۲ و ۴/۲۲ میکروگرم آمونیوم آزاد شده به ازای یک گرم خاک پس از دو ساعت انکوباسیون) و رس مونت موریلونیت (۳۹/۸۴ و ۵/۲۶ میکروگرم آمونیوم آزاد شده به ازای یک گرم خاک پس از دو ساعت انکوباسیون) بود و بیشترین شیب کاهش فعالیت این دو آنزیم پس از گذشت ۷ روز از زمان انکوباسیون مشاهده شد. رس آلی تهیه‌شده از رس مونت موریلونیت به‌خوبی قادر به نگهداری این آنزیم‌ها در خاک گردید و در نتیجه با کاربرد این رس آلی فعالیت و پایداری آنزیم‌ها در خاک افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: رس آلی، هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید، ظرفیت تبادل کاتیونی، اوره آز، ال-آسپاراژیناز

مقدمه

آنزیم‌های اوره آز و ال-آسپاراژیناز جزو مهم‌ترین آمیدو هیدرولازها بوده و نقش مهمی در هیدرولیز نیتروژن طبیعی خاک و نیتروژن آلی اضافه‌شده به خاک دارند (Acosta-Martinez and Tabatabai, 2000). این آنزیم‌ها مدت‌زمان کوتاهی در خاک فعالیت دارند زیرا به‌محض ورود به خاک به‌سرعت تجزیه یا غیرفعال شده، ساختمان خود را از دست داده و از بین می‌روند (Burns et al., 1972; Frankenberger and Tabatabai, 1980). در تحقیقات صورت گرفته مشاهده شده است که با جذب و نگهداری آنزیم‌ها روی کانی‌های رسی (Dick, 1997) و رس‌های آلی (Patil et al., 2004) از طریق جذب سطحی، به دام افتادن و هم پلیمریزه شدن می‌توان پایداری آن‌ها را افزایش داد. زیرا از دسترس فلزات سنگین و آنزیم‌های پروتئولیتیک خارج شده و پروتئین آنزیم‌ها هیدرولیز

آنزیم‌هایی که در خاک تجمع می‌یابند دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای هستند زیرا در واکنش‌های بیوشیمیایی مانند تجزیه مواد آلی، چرخه عناصر غذایی و تجزیه آلاینده‌ها نقش مهمی دارند (Acosta-Martinez et al., 2007). محققین گزارش کردند که پایداری و فعالیت آنزیم‌ها در خاک به کیفیت بقایای گیاهی، نوع کاربری، pH، فعالیت‌های میکروبی، اقلیم و آلاینده‌ها (Acosta-Martinez et al., 2007; Leinweber et al., 2008) نوع و اندازه مواد افزوده‌شده به خاک (Dick, 1997; Patil et al., 2004) بستگی دارد. در معدنی شدن نیتروژن گروه بزرگی از آنزیم‌های هیدرولاز به نام آمیدو هیدرولازها شرکت می‌کنند.

* نویسنده مسئول : lakzian@ferdowsi.um.ac.ir

نمی‌شود. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات نشان داد که فلزات سنگین از طریق واکنش با کمپلکس آنزیم-سوسپنرا، تخریب پروتئین‌های آنزیمی، واکنش با نقاط فعال آنزیم، تأثیر بر سنتز آنزیم‌ها در سلول‌های میکروبی و همچنین با ایجاد تغییراتی در جامعه میکروبی باعث کاهش فعالیت آنزیمی خاک می‌شوند (Nannipieri, 1994). حفظ توده زنده میکروبی، فعالیت و پایداری آنزیم‌ها باعث باروری خاک، افزایش فراهمی عناصر غذایی، حاصلخیزی خاک و کشاورزی پایدار می‌شود (Bastida *et al.*, 2008; Dick *et al.*, 2002; Janssens *et al.*, 2006; Cantu *et al.*, 2007; Weil and Magdoff, 2004).

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی رس آلی و اندازه‌گیری خصوصیات آن

مونت موریلونیت سدیم دار (Cloisite Na^+) مورد استفاده در این پژوهش از کشور آمریکا با خلوص ۹۵ درصد تهیه شد. سورفکتانت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (-HDTMA-Br) ساخت شرکت مرک (Merck) آلمان با وزن مولکولی ۳۶۴/۴۶ تهیه شد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از نوع آزمایشگاهی و جهت تهیه محلول‌ها و شستشو از آب مقطر و آب دیونیزه استفاده شد. جهت تهیه رس آلی ابتدا نمونه‌های رس مونت موریلونیت در هاون ساییده و از الک ۲۰۰ مش عبور داده شدند. مقدار ۲/۸۵ گرم سورفکتانت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و با همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. سپس ۱۰ گرم رس مونت موریلونیت در ۲۰۰ سی‌سی آب دیونیزه به مدت ۱۵ دقیقه به وسیله امواج ماورای صوت جداسازی شدند. محلول سورفکتانت به رس مونت موریلونیت اضافه و به مدت سه ساعت با همزن مغناطیسی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. سوسپانسیون نهایی سانتریفیوژ شده (مدت‌زمان ۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه) و ۸ بار متوالی با آب مقطر شسته شد. سپس در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و در هاون کوبیده و از الک ۲۰۰ مش عبور داده شد (Li *et al.*, 2010). رس آلی مونت موریلونیت تهیه‌شده با استفاده از مونت موریلونیت و سورفکتانت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید، Mt-HDTMA نام‌گذاری شد. ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) رس مونت موریلونیت و رس آلی با استفاده از روش استات آمونیوم (Zhu *et al.*, 2007) تعیین شد. پس از سنتز و تولید رس‌های مورد نظر جهت بررسی خصوصیات ساختاری و مورفولوژی رس‌های سنتز شده از

کانی‌های مونتوریلونیت سیلیکات‌های ورقه‌ای نوع ۲:۱، دی اکتاهدرال با بار لایه‌ای ۰/۲-۰/۴ هستند که دارای درجه هیدراسیون، سطح روبه، ظرفیت تبادل کاتیونی، گنجایش نگهداری آب و قدرت جذب بالایی می‌باشند، از این رو جزء کانی‌های مهم در بخش رس خاک محسوب می‌شوند (Shrigadi *et al.*, 2003; Galindo-Gonzalez *et al.*, 2005; Sarioglan *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). مونتوریلونیت یک کانی ارزان، فراوان با خصوصیات عالی است که در کشاورزی، محیط‌زیست، صنعت و مهندسی دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد (Shrigadi *et al.*, 2003; Galindo-Gonzalez *et al.*, 2005).

به‌خوبی کاتیون‌های فلزی را جذب می‌کند، اما ظرفیت پایینی برای جذب آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و سایر ترکیبات آلی با بار منفی و خنثی دارد. حال اگر یون‌های غیر آلی کانی مونتوریلونیت با یون‌های آلی جایگزین شود، رس آلی تشکیل‌شده توانایی جذب ترکیبات آلی غیر یونی و آنیون‌ها از قبیل آنزیم‌ها را خواهد داشت (Bors *et al.*, 2000; An and Stefan, 2007). سورفکتانت‌های (مواد فعال سطحی) متفاوتی در تهیه رس‌های آلی استفاده می‌شود، از جمله آن‌ها سورفکتانت‌های کاتیونی یک‌لایه و دولایه (Yilmaz and Yapar, 2004)، سورفکتانت‌های کاتیونی-آنیونی (Zhang *et al.*, 2013) و سورفکتانت‌های یونی و غیر یونی (Zhuang *et al.*, 2015) می‌باشند. یکی از روش‌ها جهت تهیه رس آلی استفاده از کاتیون‌های آلی دارای بیش از ۱۰ کربن در گروه هیدروکربن آلکیل خود می‌باشد. کاتیون‌های آلی با رس‌ها واکنش داده، آن‌ها را از حالت آب‌دوست به آب‌گریز تبدیل می‌کنند و در نتیجه رس‌ها توانایی جذب و نگهداری ترکیبات آلی غیر یونی و آنیون‌ها از قبیل آنزیم‌ها را پیدا می‌کنند، این رس‌ها ترکیبات پایداری هستند و سورفکتانت‌ها به راحتی نمی‌توانند جدا شوند و حتی می‌توان با انتخاب نوع سورفکتانت تا حدودی آن‌ها را اختصاصی کرد

تولون، ۹ میلی لیتر بافر تریس و یک میلی لیتر محلول اوره (۰/۲ مولار) به عنوان سوپسترا اضافه شد، چرخانده تا کاملاً مخلوط شود. درب بالن حجمی را بسته به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. آمونیوم آزاد شده در اثر فعالیت آنزیم اوره آز به وسیله کلرید پتاسیم استخراج شد (Kandeler et al., 2011). تیمار شاهد نیز در نظر گرفته شد، تنها تفاوت تیمار شاهد در این است که این تیمار قبل از انکوباسیون سوپسترا دریافت نمی کند. میزان نیتروژن آمونیومی استخراج شده با روش ایندوفنل بلو (Bashour and Sayegh, 2007) اندازه گیری و فعالیت آنزیم بر اساس میکروگرم آمونیوم آزاد شده به ازای یک گرم خاک پس از دو ساعت انکوباسیون بر اساس منحنی کالیبراسیون گزارش شد. جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز از روش مشابه اوره آز استفاده شد با این تفاوت که سوپسترا یک میلی لیتر محلول ال-آسپاراژین (۰/۵ مولار) بود (Kandeler et al., 2011).

آنالیز آماری داده ها

نتایج حاصل با نرم افزار MINITAB به صورت فاکتوریل و بر مبنای طرح کامل تصادفی مورد آنالیز قرار گرفت. میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شده و برای رسم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel XP استفاده گردید.

یافته ها

ویژگی های رس آلی

در این مطالعه ظرفیت تبادل کاتیونی رس مونت موریلونیت سدیم دار ۸۹/۹ میلی اکوی والان در ۱۰۰ گرم و در رس آلی مونت موریلونیت اصلاح شده ۴۲/۴ میلی اکوی والان در ۱۰۰ گرم محاسبه شد یعنی در حدود ۵۰ درصد ظرفیت تبادل کاتیونی کاهش یافت. خواص مواد سنتز شده به شکل و اندازه آن ها بستگی دارد. در نتیجه مطالعه در زمینه شکل، اندازه و آرایش مواد جهت تعیین کاربردهای مختلف آن ها در موارد گوناگون دارای اهمیت ویژه ای می باشد. مورفولوژی مشاهده شده در مونت موریلونیت و رس آلی مونت موریلونیت در شکل (۱ a و b) در دو بزرگنمایی نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می شود مونت موریلونیت بیشتر حالت توده ای داشته و لایه های سیلیکاتی در بزرگنمایی زیاد در آن قابل تشخیص نیست، اما پس از اصلاح با سورفکتانت ذراتی با اندازه بزرگ تر و سطح متخلخل ایجاد شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدانی (FESEM) مدل Tscan Vega-II، ساخت کشور جمهوری چک استفاده شد.

نمونه برداری از خاک

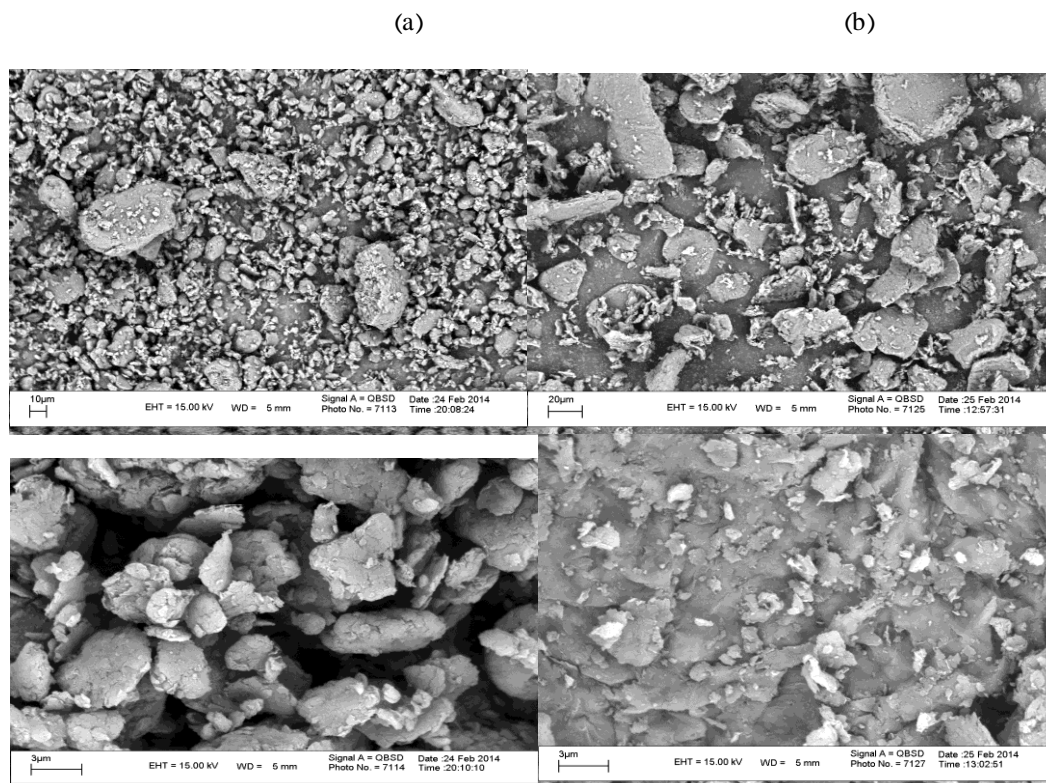
در مرحله بعدی تحقیق ابتدا مزرعه مورد نظر انتخاب و نمونه برداری مرکب از عمق ۲۰ سانتی متر خاک مزرعه زراعی دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت. بدین ترتیب که ۲۰ نمونه خاک از منطقه مورد مطالعه برداشته و برای تهیه نمونه مرکب، با هم مخلوط گردیدند. خاک مورد آزمایش دارای بافت لومی شنی، ۰/۴ درصد کربن آلی، pH گل اشباع ۷/۹ و ظرفیت تبادل کاتیونی ۶/۶ میلی اکوی والان در ۱۰۰ گرم خاک خشک بود. ذرات درشت و سنگ ها جداسازی و خاک از الک ۲ میلی متر عبور داده شد. ۵۰ گرم از هر نمونه خاک در ظروف پلی اتیلن با ابعاد ۱۰×۱۰×۱۰ سانتی متر ریخته و جهت عمل تهویه چند سوراخ روی آن ها ایجاد شد. نمونه های خاک در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و رطوبت نمونه ها روزانه در حد ۶۰ درصد حداکثر ظرفیت نگهداری آب تنظیم شد. بعد از گذشت ۵ روز نمونه ها جهت مراحل بعدی تحقیق آماده شدند. خاک ها با دو نوع رس مونت موریلونیت و رس آلی مونت موریلونیت تغییر یافته با هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید تیمار شدند. بدین منظور ۲۵ گرم از نمونه خاک ها سترون شده و خاک های سترون و غیر سترون با دو نوع رس فوق تیمار شدند. برای سترون سازی نمونه های خاک، از اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ پاسکال به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. نمونه های تهیه شده به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوباسیون گردید و در ۵، ۷، ۱۴، ۲۱ روز فعالیت دو آنزیم ال-آسپاراژیناز و اوره آز اندازه گیری شد (Kandeler et al., 2011).

تیمارها و طرح آزمایشی

فاکتورهای آزمایشی در این پژوهش شامل فاکتور رس در سه سطح (بدون افزودن رس (شاهد)، رس مونت موریلونیت و رس آلی)، فاکتور انکوباسیون در ۵ سطح (۰، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) و فاکتور وضعیت خاک در دو سطح (سترون و غیر سترون) بود. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار انجام شد.

۴- ارزیابی آنزیم های اوره آز و ال-آسپاراژیناز

جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم اوره آز ۵ گرم خاک هوا خشک در یک بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری ریخته، ۰/۲ میلی لیتر

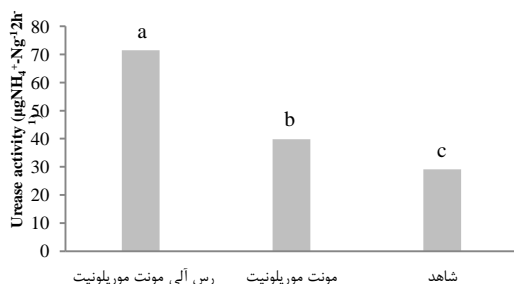


شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) رس مونت موریلونیت سدیم‌دار در سمت چپ (a) و رس آلی مونت موریلونیت در سمت راست (b) در دو بزرگنمایی

اثر تیمارها بر فعالیت آنزیم اوره‌آز

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز آماری تأثیر تیمار نوع رس، مدت‌زمان انکوباسیون و تأثیر متقابل آن‌ها بر فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل‌های (۲)، (۳) و (۴)). شکل (۲) فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک غیر سترون و خاک تیمار شده با دو نوع رس مونت موریلونیت و رس آلی مونت موریلونیت برحسب میکروگرم آمونیوم آزادشده به ازای یک گرم خاک پس از دو ساعت انکوباسیون را نشان می‌دهد، همان‌طور که در شکل مشهود است تفاوت چشم‌گیری در فعالیت آنزیم اوره‌آز با افزودن رس آلی مونت موریلونیت مشاهده شد. شکل (۴) فعالیت این آنزیم را در حضور رس مونت موریلونیت و رس آلی مونت موریلونیت با گذشت زمان نشان می‌دهد. بر اساس این پژوهش بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز به ترتیب مربوط به خاک تیمار شده با رس آلی مونت موریلونیت پس از گذشت ۷ روز انکوباسیون و شاهد (خاک بدون تیمار) در زمان صفر بود. با بررسی شکل (۴) مشاهده شد که با گذشت زمان در نمونه شاهد که فقط خاک مزرعه است به‌طور تقریبی فعالیت آنزیم اوره‌آز در طول زمان ثابت شده است؛ اما در نمونه‌ای که با رس مونت موریلونیت و رس آلی تیمار شده است فعالیت آنزیم‌ها در ابتدا تا ۷ روز افزایش یافته و بعد از گذشت ۱۴ روز کاهش یافت. بیشترین

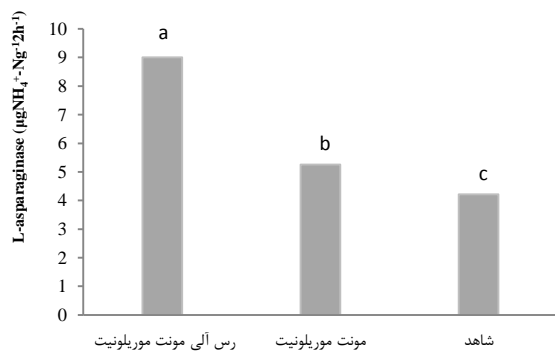
شیب کاهش فعالیت این آنزیم پس از ۷ روز به‌وضوح آشکار است. میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز در نمونه خاک تیمار شده با رس آلی به‌طور چشمگیری بالاتر از نمونه شاهد و رس مونت موریلونیت است و بیشترین شیب کاهش فعالیت این آنزیم پس از ۷ روز مشاهده شد. در شکل (۵) فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز در خاک سترون در حضور رس مونت موریلونیت و رس آلی مونت موریلونیت با گذشت زمان نشان داده شده است. نتایج نشان داد که در خاک سترون فعالیت آنزیم اوره‌آز در همه نمونه‌های خاک صفر است که مشخص می‌کند در خاک سترون موجود زنده‌ای وجود نداشته و رس‌های اضافه‌شده خود نیز هیچ فعالیت آنزیمی نداشتند.



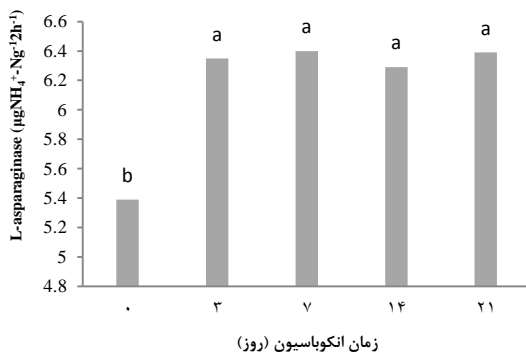
شکل ۲- فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک غیر سترون در حضور رس مونت موریلونیت و رس آلی

میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند (SEM=۰/۸۹، MS_e=۷/۹۲)

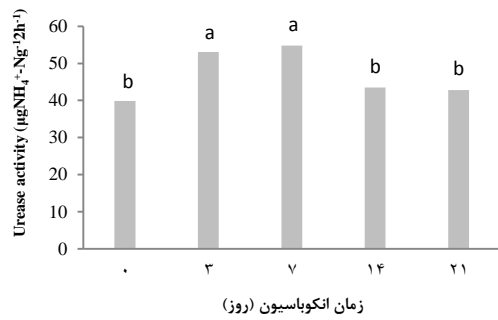
رس مونت موریلونیت و رس آلی مونت موریلونیت را نشان داده و تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز با افزودن رس آلی مونت موریلونیت مشاهده شد. در شکل (۸) فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در خاک در حضور رس مونت موریلونیت و رس آلی مونت موریلونیت با گذشت زمان نشان داده شده است نتایج حاصل از آنالیز نشان داد که با گذشت زمان انکوباسیون در نمونه شاهد به‌طور تقریبی فعالیت ال-آسپاراژیناز در طول زمان ثابت بود؛ اما در نمونه‌ای که با رس مونت موریلونیت تیمار شده فعالیت آنزیم در ابتدا تا ۳ روز افزایش یافته و بعد از گذشت ۷ روز روند تغییرات ثابت شد؛ اما در نمونه‌ای که با رس آلی مونت موریلونیت تیمار شده فعالیت آنزیم‌ها در ابتدا تا ۷ روز افزایش یافته و بعد از گذشت ۱۴ روز این تغییرات روند نسبتاً ثابتی را دنبال کردند. میزان فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در نمونه خاک تیمار شده با رس آلی به‌طور چشمگیری بالاتر از نمونه شاهد و رس مونت موریلونیت است. بیشترین شیب کاهش فعالیت این آنزیم پس از ۷ روز مشاهده شد.



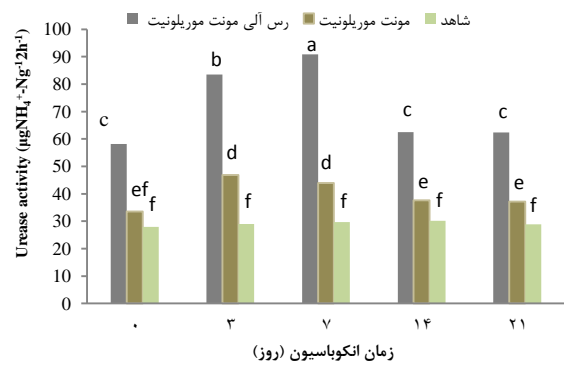
شکل ۶- فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در خاک غیر سترون در حضور رس مونت موریلونیت و رس آلی، میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند (SEM=۰/۱۴، MS_e=۰/۱۸)



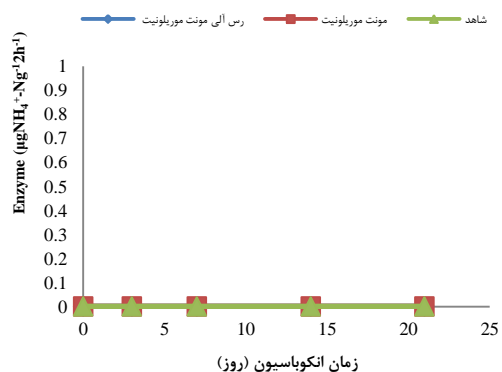
شکل ۷- فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در خاک غیر سترون با گذشت مدت‌زمان انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند (SEM=۰/۱۷، MS_e=۰/۱۸)



شکل ۳- فعالیت آنزیم اوره آز در خاک غیر سترون با گذشت مدت‌زمان انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند (SEM=۱/۱۵، MS_e=۷/۹۲)



شکل ۴- فعالیت آنزیم اوره آز در خاک غیر سترون در حضور رس مونت موریلونیت و رس آلی در مدت انکوباسیون، میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند (SEM=۱/۹۹، MS_e=۷/۹۲)



شکل ۵- فعالیت آنزیم اوره آز و ال-آسپاراژیناز در خاک سترون در حضور رس مونت موریلونیت و رس آلی در مدت انکوباسیون

اثر تیمارها بر فعالیت ال-آسپاراژیناز

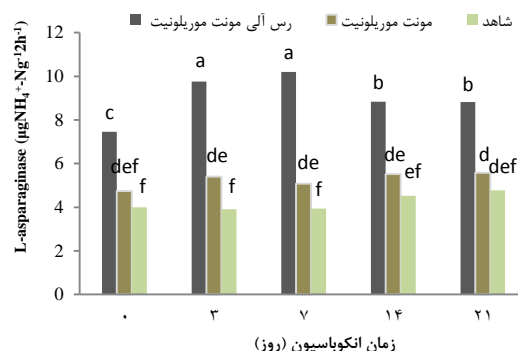
بر اساس نتایج حاصل از آنالیز آماری تأثیر تیمار نوع رس، مدت‌زمان انکوباسیون و تأثیر متقابل آن‌ها نیز بر فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز خاک نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل‌های (۶)، (۷) و (۸)). شکل (۶) فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در خاک غیر سترون و خاک تیمار شده با دو نوع

فراوان موجود در این مواد آلی امکان عبور بسترها و همچنین خروج محصولات وجود دارد در نتیجه قادر به حفظ فعالیت خود هستند (Pettit et al., 1972; Burns et al., 1972; Gianfreda et al., 1992). رس‌ها از جمله مهم‌ترین فراهم‌کنندگان سطوح مشترک برای جذب و غیرمتحرک سازی آنزیم‌های مختلف خاک می‌باشند. در این میان مونتموریلونیت یک کانی ارزان، فراوان با خصوصیات عالی است (Shrigadi et al., 2003; Galindo-Gonzalez et al., 2005). این کانی به‌خوبی کاتیون‌های فلزی را جذب می‌کند، اما ظرفیت پایینی برای جذب آنزیم‌ها دارد. حال اگر یون‌های غیر آلی کانی مونتموریلونیت با یون‌های آلی جایگزین شود، رس آلی تشکیل شده که توانایی جذب ترکیبات آلی غیر یونی و آنیون‌ها از قبیل آنزیم‌ها را دارند (Bors et al., 2000; An and Stefan, 2007). تحقیقات نشان داده که اتصال آنزیم‌های خارج سلولی به کمپلکس‌های آلی و معدنی پایداری آن‌ها را در محلول خاک افزایش داده (Huang and Schnitzer, 1986) و باعث افزایش پایداری آنزیم‌ها نسبت به عواملی چون تجزیه، گرما، پرتوافکنی گاما و افزایش توان ذخیره‌سازی آنزیم‌ها شده که به لحاظ تجاری دارای اهمیت ویژه‌ای است (Zantua and Bremner, 1978; Nannipieri et al., 1977).

در این تحقیق مشاهده شد که جذب آنزیم‌ها بر سطح رس پایداری آن‌ها را نسبت به زمان افزایش می‌دهد. در پژوهش دیگری نیز مشاهده شد که آنزیم‌های اوره آز و α -آمیلاز جذب‌شده بر سطح نانو تیوپ‌های هالوسایت پس از ۱۵ روز نگهداری در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد همچنان بیش از ۹۰ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ کرده‌اند (Zhai et al., 2010). همچنین در تحقیقی دیگر مشاهده شد که جذب کاتالاز بر سطح دو رس بنتونیت و سپیولیت فعالیت نسبی این آنزیم را در مقایسه با آنزیم آزاد به میزان قابل توجهی حفظ نموده و تنها بخش بسیار ناچیزی از پایداری عملکرد آن پس از جذب بر سطح این رس‌ها کاهش یافت (Cengiz et al., 2012).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه رس آلی مونتموریلونیت اصلاح‌شده با سورفکتانت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید تهیه و مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ظرفیت تبادل کاتیونی این رس آلی نسبت به رس مونتموریلونیت حدود ۵۰ درصد کاهش و در نتیجه ظرفیت جذب آنیونی رس افزایش یافت. رس‌های مونتموریلونیت ظرفیت تبادل کاتیونی بالایی دارند اما برای جذب بیشتر آنزیم‌ها بایستی ظرفیت جذب آنیونی رس بالا



شکل ۸- فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در خاک غیر سترون در حضور رس مونتموریلونیت و رس آلی در مدت انکوباسیون، میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند ($MS_e=0.18$), ($SEM=0.30$)

بحث

رس‌های مونتموریلونیت ظرفیت تبادل کاتیونی بالایی دارند و به‌طور متداول حدود ۸۰-۱۵۰ میلی اکی والان در ۱۰۰ گرم است. چون ظرفیت تبادل کاتیونی آن‌ها بالاست می‌توانند مخزنی برای عناصر کاتیونی از قبیل سدیم، پتاسیم، آمونیوم، کلسیم، روی، مس، منیزیم و ... باشند (Volzone et al., 2006). در این پژوهش ظرفیت تبادل کاتیونی رس مونتموریلونیت ۸۹/۸ میلی اکی والان در ۱۰۰ گرم بود که با اصلاح این رس توسط سورفکتانت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید به حدود ۴۲/۹ میلی اکی والان در ۱۰۰ گرم رسید که نشان می‌دهد ظرفیت تبادل کاتیونی در حدود ۵۰ درصد کاهش یافته و به دنبال این کاهش، ظرفیت جذب آنیونی رس آلی اصلاح‌شده افزایش یافته و در نتیجه این رس توانایی جذب بیشتر آنزیم‌ها را پیدا کرده است. همچنین تصویربرداری و آنالیز با میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز نشان داد که لایه‌های سیلیکاتی به دلیل ورود سورفکتانت به فضای بین لایه‌ای و واکنش زنجیره‌های کربن ترکیب آلی با سطوح رس باعث انبساط شده و دارای ابعاد نانومتری شده‌اند.

بررسی روند فعالیت آنزیم‌ها نشان دهنده آن است که آنزیم‌ها در مدت کوتاهی پس از ورود به محیط خاک تا حدودی تجزیه شده یا فعالیت آن‌ها کاهش می‌یابد. تحقیقات زیادی مبنی بر تجزیه سریع آنزیم‌ها و غیرفعال شدن آن‌ها بلافاصله پس از ورود به خاک وجود دارد (Burns et al., 1972; Frankenberger and Tabatabai, 1980)؛ اما با افزودن رس مونتموریلونیت و رس آلی مقادیر زیادی از این آنزیم‌ها با سطوح این رس‌ها ایجاد کمپلکس داده که در این میان رس آلی کارایی بالاتری داشته است. آنزیم‌هایی که درون ترکیبات آلی کمپلکس داده و غیر متحرک می‌شوند، در برابر آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین مقاوم می‌شوند باین‌حال به علت منافذ

انکوباسیون و شاهد در زمان صفر بود. به‌طور کلی با این تغییرات رس آلی تهیه‌شده می‌تواند به‌عنوان بستر مناسبی برای حفظ و نگهداری طولانی‌مدت آنزیم‌ها بدون کاهش فعالیت آن‌ها عمل کند و این تغییرات برای تهیه رس آلی مونت موریلونیت ارزان به‌منظور افزایش فعالیت و پایداری آنزیم‌های خاک و همچنین افزایش ذخیره‌سازی آنزیم‌ها در حفظ محیط‌زیست، کشاورزی پایدار و تجارت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

رود که در این مطالعه مشاهده شد با اصلاح رس‌های مونت موریلونیت با سورفکتانت‌های کاتیونی و تبدیل آن‌ها به رس آلی توانایی جذب آنزیم‌ها بیشتر می‌شود. این بررسی نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌ها در نمونه خاک تیمار شده با رس آلی به‌طور معنی‌داری بالاتر از نمونه شاهد (خاک بدون تیمار) و رس مونت موریلونیت است. بر اساس این پژوهش بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم‌ها به ترتیب مربوط به خاک تیمار شده با رس آلی مونت موریلونیت پس از گذشت ۷ روز

REFERENCES

- Acosta-Martinez, V. and Tabatabai M. A. (2000). Arylamidase activity of soils. *Soil Science of Society of America Journal*, 64(1), 215-21.
- Acosta-Martinez, V., Cruz, L., Sotomayor-Ramirez, D. and Perez-Alegria, L. (2007). Enzyme activities as affected by soil properties and land use in tropical watershed. *Applied Soil Ecology*, 35(1), 35-45.
- An, J. H. and Stefan, D. (2007). Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties. *Applied Clay Science*, 36(4), 256-264.
- Bashour, I. I. and Sayegh, A. H. (2007). Methods of analysis for soils of arid and semi arid regions: *Food and agriculture organization of the united nations*.
- Bastida, F. Z. A., Hernandez, H. and Garcia, C. (2008). Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma*, 147(3-4), 159-171.
- Bors, J., Dultz, S. and Riebe, B. (2000). Organophilic bentonites as adsorbents for radionuclides: II. Chemical and mineralogical properties of HDPy-montmorillonite. *Applied Clay Science*, 16(1-2), 15-29.
- Burns, R. G., Pukite, A. H. and McLaren, A. (1972). Concerning the location and persistence of soil urease. *Soil Science Society of America Journal*, 30(2), 308-311.
- Cantu, M. B. A., Bedano, C. and Schiavo, H. (2007). Evaluacion de la calidad de suelos mediante el uso de indicadores e indices. *Ci Suelo*, 25(2), 173-8.
- Cengiz, S., Cavas, L. and Yurdokoc, K. (2012). Bentonite and sepiolite as supporting media: immobilization of catalase. *Applied Clay Science*, 65-66, 114-120.
- Dick, R. P. (1997). Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In C. E. Pankhurst, B. M. Doube, and V. V. S. R. Gupta (Eds.), *Biological indicators of soil health* (pp. 121-156). Cab international, UK.
- Dick, R. P., Sandeno, J., Taylor, A., Wagner, R., Pascoe, N. and Knight, T. (2002). Soil enzyme activity as a sensitive indicator of ecosystem disturbance. In: *Proceedings of 17th World Congress of Soil Science*, 14-21 Aug., Bangkok, Thailand, p. 1056.
- Frankenberger, W. T. and Tabatabai, M. A. (1980). Amidase Activity in Soils: II. Kinetic parameters. *Soil Science Society of America Journal*, 44(3), 532-536.
- Galindo-Gonzalez, C., Vicente, J. D., Ramos-Tejada, M. M., Lopez-Lopez, M. T., Gonzalez-Caballero, F. and Duran, J. D. G. (2005). Preparation and sedimentation behavior in magnetic fields of magnetite-covered clay particles. *Langmuir*, 21(10), 4410-4419.
- Gianfreda, L., Rao, M. A. and Violante, A. (1992). Adsorption activity and kinetic properties of urease and Al(OH)_x montmorillonite, aluminium hydroxide and montmorillonite complexes. *Journal of Soil Biology and Biochemistry*, 24, 51-58.
- Huang, P. M. and Schnitzer, M. (1986). Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. *Madison: Soil Science Society of America*. USA: Madison, Wisconsin
- Janssens, J., Deng, Z., Sonwa, D., Torrico, J. C., Mulindabigwi, V. and Pohlen, J. (2006). Relating agro-climax of orchards to eco-climax of natural vegetation. *Acta Horticulturae*, 707, 181-186.
- Jung, L. C., Wang, C. C., Lee, C. and Hsu, T. (2007). Dyes adsorption onto organoclay and MCM-41. *Journal of Environmental Engineering and Management*, 17(1), 29-38.
- Kandeler, E., Poll, C., Frankenberger, W. T. and Tabatabai, M. A. (2011). Nitrogen cycle enzymes. In R. P. Dick (Ed.), *Methods of soil enzymology* (pp 211-245). Soil Science Society of America, Madison.
- Leinweber, P., Jandl, G., Baum, C., Eckhardt, K. U. and Kandeler, E. (2008). Stability and composition of soil organic matter control respiration and soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(6), 1496-1505.
- Li, S., Wu, P., Li, H., Zhu, N., Li, P., Wu, J., Wang, X. and Dang, Z. (2010). Synthesis and characterization of organo montmorillonite supported iron nanoparticles. *Applied Clay Sciences*, 50, 330-336.
- Nannipieri, P. (1994). The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In C. E. Pankhurst, M. Doube, G. S. R. and P. R. Grace (Eds.), *Soil*

- Biota, Management in Sustainable Farming Systems* (pp. 238-244). CSIRO Publications, Australia.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S. and Sequi, P. (1978). Stability and kinetic properties of humus-urease complexes. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(2), 359-362.
- Patil, A. J., Muthusamy, E. and Mann, S. (2004). Synthesis and self-assembly of organoclay-wrapped biomolecules. *Angewandte Chemie*, 116(37), 5036-5041.
- Pettit, N. m., Smith, A. R. J., Freedman, R. B. and Burns, R. G. (1976). Soil urease: activity, stability and kinetic properties. *Journal of Soil Biology and Biochemistry*, 8, 479-484.
- Sarioglan, S., Gurbuz, S., Ipeksac, T., Sedan, M. G. and Erol, M. (2014). Pararosaniline and crystal violet tagged montmorillonite for latent fingerprint investigation. *Applied Clay Science*, 87, 235-244.
- Shrigadi, N. B., Shinde, A. B. and Samant, S. D. (2003). Study of catalytic activity of free and K10-supported iron oxyhydroxides and oxides in the Friedel-Crafts benzoylation reaction using benzyl chloride/alcohol to understand their role in the catalysis by the Fe-exchanged/impregnated K10 catalysts. *Applied Catalysis A: General*, 252(1), 23-35.
- Wang, C. C., Juang, L. C., Lee, C. K., Hsu, T. C., Lee, J. F. and Chao, H. P. (2004). Effects of exchanged surfactant cations on the pore structure and adsorption characteristics of montmorillonite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 280(1), 27-35.
- Weil, R. and Magdoff, F. (2004). Significance of soil organic matter to soil quality and health: Advances in Agroecology. In F. Magdoff, and R. Weil (Eds.), *Soil organic matter in sustainable agriculture* (pp. 1-43). CRC Press, Boca Raton.
- Wu, L., Liao, L., Lv, G., Qin, F. and Li, Z. (2014). Microstructure and process of intercalation of imidazolium ionic liquids into montmorillonite. *Chemical Engineering Journal*, 236, 306-313.
- Yilmaz, N. and Yapar, S. (2004). Adsorption properties of tetradecyl- and hexadecyltrimethylammonium bentonites. *Applied Clay Science*, 27(3), 223-228.
- Zantua, M. I. and Bremner, J. M. (1977). Stability of urease in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(2), 135-140.
- Zhai, R., Zhang, B., Liu, L., Xie, Y., Zhang, H. and Liu, J. (2010). Immobilization of enzyme biocatalyst on natural halloysite nanotubes. *Catalysis Communications*, 12(4), 259-263.
- Zhang, Z., Zhang, J., Liao, L. and Xia, Z. (2013). Synergistic effect of cationic and anionic surfactant for the modification of Ca-montmorillonite. *Material Research Bulletin*, 48(5), 1811-1816.
- Zhu, L. Z., Zhu, R. L., Xu, L.H. and Ruan, X. X. (2007). Influence of clay charge densities and surfactant loading amount on the microstructure of CTMA-montmorillonite hybrids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 304(1), 41-48.
- Zhuang, G., Zhang, Z., Guo, J., Liao, L. and Zhao, J. (2015). A new ball milling method to produce organo-montmorillonite from anionic and nonionic surfactants. *Applied clay science*, 104, 18-26.