تحقیقات آب و خاک ایران، دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۴، آذر و دی ۱۳۹۶ (ص ۷۸۸-۷۸۱) DOI: 10.22059/ijswr.2017.200215.667400

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

محبوبه ابوالحسنی زراعتکار[۱]، امیر لکزیان[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 موردمطالعه 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 آزادشده 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 آزادشده به ازای یک گرم خاک پس از دو ساعت انکوباسیون) و رس مونت موریلونیت (۳۹/۸۴ و ۵/۲۶ میکروگرم آمونیوم آزادشده 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، اوره‌آز، ال-آسپاراژیناز

Archive of SID

مقدمه

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. آنزیم‌های اوره‌آز 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 ازدست‌داده 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

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

www.SID.ir

نمی‌شود. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات نشان داد که فلزات سنگین از طریق واکنش با کمپلکس آنزیم-سوبسترا، 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).

کانی‌های مونتموریلونیت سیلیکات‌های ورقه‌ای نوع ۲:۱، دی اکتاهدرال با بار لایه‌ای ۰/۴-۰/۲ هستند که دارای درجه هیدراسیون، سطح رویه، ظرفیت تبادل کاتیونی، گنجایش نگهداری آب و قدرت جذب بالایی می‌باشند، ازاین‌رو 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). مونتموریلونیت 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). این کانی 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 مونتموریلونیت 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 به‌راحتی نمی‌توانند جدا شوند و حتی می‌توان با انتخاب نوع سورفکتانت تا حدودی آن‌ها را اختصاصی کرد (Yilmaz and Yapar, 2004; Wang *et al*., 2004). بنابراین با توجه به اهمیت آنزیم‌های آمیدوهیدرولاز و نقش بسیار مؤثر آن‌ها در حفظ محیط‌زیست و کشاورزی پایدار، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر ارگانو مونتموریلونیت اصلاح‌شده با سورفکتانت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید طبیعی و کم‌هزینه، رس مونت موریلونیت و زمان‌های مختلف انکوباسیون بر فعالیت و پایداری آنزیم اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز انجام شد. تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه صورت نگرفته است، لذا انجام تحقیق و بررسی در این زمینه ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی رس آلی و اندازه‌گیری خصوصیات آن

مونت موریلونیت سدیم دار ($Cloisite\ Na^+$) مورداستفاده 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 مورداستفاده 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 به‌وسیله 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 مویلونیت 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 موردنظر جهت بررسی خصوصیات ساختاری و مورفولوژی رس‌های سنتز شده از

Archive of SID

www.SID.ir

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

نمونه‌برداری از خاک

در مرحله بعدی تحقیق ابتدا مزرعه موردنظر انتخاب و نمونه‌برداری مرکب از عمق ۲۰ سانتی‌متر خاک مزرعه زراعی دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت. بدین ترتیب که ۲۰ نمونه خاک از منطقه موردمطالعه 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 اکی والان در ۱۰۰ گرم خاک خشک بود. ذرات درشت و سنگ‌ها جداسازی و خاک از الک ۲ میلی‌متر عبور داده شد. ۵۰ گرم از هر نمونه خاک در ظروف پلی‌اتیلن با ابعاد ۱۰×۱۰×۱۰ سانتی‌متر ریخته و جهت عمل تهویه چند سوراخ روی آن‌ها ایجاد شد. نمونه‌های خاک در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و رطوبت نمونه‌ها روزانه در حد ۶۰ درصد حداکثر ظرفیت نگهداری آب تنظیم شد. بعد از گذشت ۵ روز نمونه‌ها جهت مراحل بعدی تحقیق آماده شدند. خاک‌ها با دو نوع رس مونتموریلونیت و رس آلی مونتموریلونیت تغییریافته با هگزا دسیل تری متیل آمونیوم برومید تیمار شدند. بدین منظور ۲۵ گرم از نمونه خاک‌ها سترون‌شده و خاک‌های سترون و غیر سترون با دو نوع رس فوق تیمار شدند. برای سترون‌سازی نمونه‌های خاک، از اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پاسکال به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. نمونه‌های تهیه‌شده به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوباسیون گردید و در ۵ زمان (۰، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) فعالیت دو آنزیم ال-آسپاراژیناز و اوره آز اندازه‌گیری 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 به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار انجام شد.

۴- ارزیابی آنزیم‌های اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره آز ۵ گرم خاک هوا خشک در یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری ریخته، ۰/۲ میلی‌لیتر تولوئن، ۹ میلی‌لیتر بافر تریس و یک میلی‌لیتر محلول اوره (۰/۲ مولار) به‌عنوان سوبسترا اضافه شد، چرخانده تا کاملاً مخلوط شود. درب بالن حجمی را بسته به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. آمونیوم آزادشده در اثر فعالیت آنزیم اوره آز به‌وسیله 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 سوبسترا دریافت نمی‌کند. میزان نیتروژن آمونیومی استخراج‌شده با روش ایندوفنل بلو (Bashour and Sayegh, 2007) اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم بر اساس میکروگرم آمونیوم آزادشده به ازای یک گرم خاک پس از دو ساعت انکوباسیون بر اساس منحنی کالیبراسیون گزارش شد. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز از روش مشابه اوره آز استفاده شد با این تفاوت که سوبسترا یک میلی‌لیتر محلول ال-آسپاراژین (۰/۵ مولار) بود (Kandeler *et al*., 2011).

آنالیز آماری داده‌ها

نتایج حاصل با نرم‌افزار MINITAB به‌صورت فاکتوریل و بر مبنای طرح کامل تصادفی مورد آنالیز قرار گرفت. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شده و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel XP استفاده گردید.

یافته‌ها

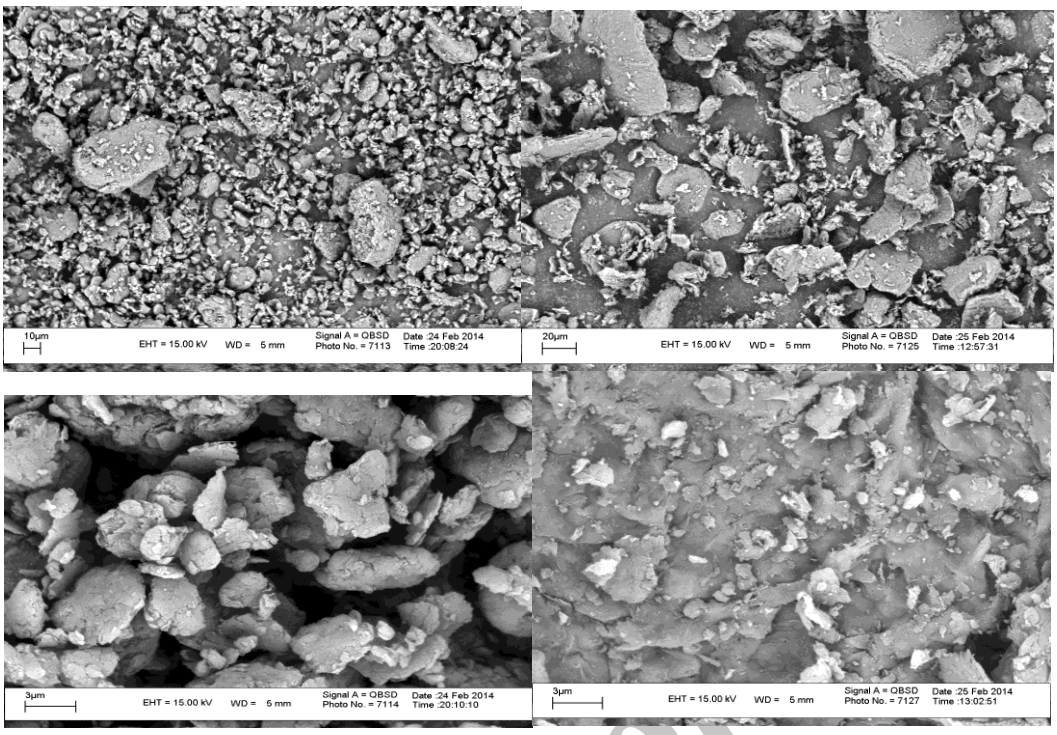
ویژگی‌های رس آلی

در این مطالعه ظرفیت تبادل کاتیونی رس مونت موریلونیت سدیم دار ۸۹/۹ میلی اکی والان در ۱۰۰ گرم و در رس آلی مونت موریلونیت اصلاح‌شده ۴۲/۴ میلی اکی والان در ۱۰۰ گرم محاسبه شد یعنی در حدود ۵۰ درصد ظرفیت تبادل کاتیونی کاهش یافت. خواص مواد سنتز شده به شکل و اندازه آن‌ها بستگی دارد. در نتیجه مطالعه در زمینه شکل، اندازه و آرایش مواد جهت تعیین کاربردهای مختلف آن‌ها در موارد گوناگون دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. مورفولوژی مشاهده‌شده در مونت موریلونیت و رس آلی مونت موریلونیت در شکل (۱ (a و b)) در دو بزرگنمایی نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود مونت موریلونیت بیشتر حالت توده‌ای داشته و لایه‌های سیلیکاتی در بزرگنمایی زیاد در آن قابل‌تشخیص نیست، اما پس از اصلاح با سورفکتانت ذراتی با اندازه بزرگ‌تر و سطح متخلخل ایجاد شد.

Archive of SID

www.SID.ir

(a) (b)



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 اوره آز خاک در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل‌های (۲)، (۳) و (۴)). شکل (۲) فعالیت آنزیم اوره آز 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 اوره آز 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 اوره آز 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 اوره آز 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 اوره آز 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 اوره آز 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 اوره آز 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 اوره آز در خاک غیر سترون در حضور رس مونت موریلونیت و رس آلی

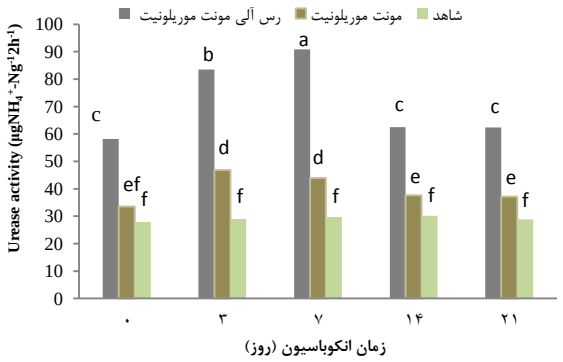
میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند (MS_e=۷/۹۲ ،SEM=۰/۸۹)

Archive of SID
www.SID.ir

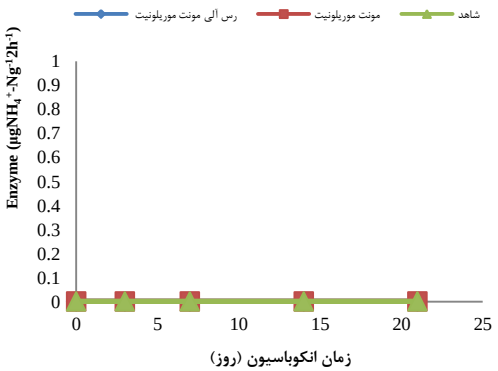
شکل ۳- فعالیت آنزیم اوره آز در خاک غیر سترون با گذشت مدت‌زمان انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند

(SEM=۱/۱۵ ،MS_e=۷/۹۲)



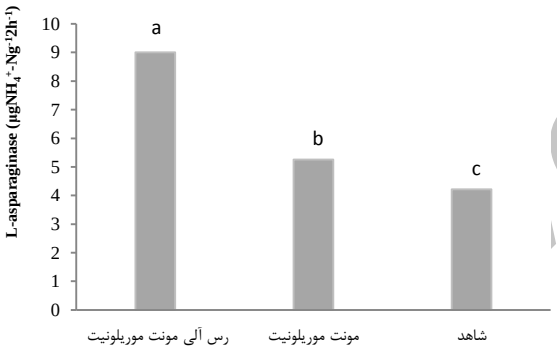
شکل ۴- فعالیت آنزیم اوره آز در خاک غیر سترون در حضور رس مونت موریلونیت و رس آلی در مدت انکوباسیون، میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند (MS_e=۷/۹۲ ،SEM=۱/۹۹)



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

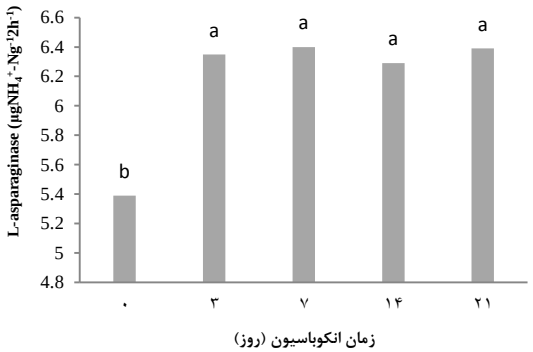
بر اساس نتایج حاصل از آنالیز آماری تأثیر تیمار نوع رس، مدت‌زمان انکوباسیون و تأثیر متقابل آن‌ها نیز بر فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز خاک نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل‌های (۶)، (۷) و (۸)). شکل (۶) فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در خاک غیر سترون و خاک تیمار شده با دو نوع رس مونت موریلونیت و رس آلی مونت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

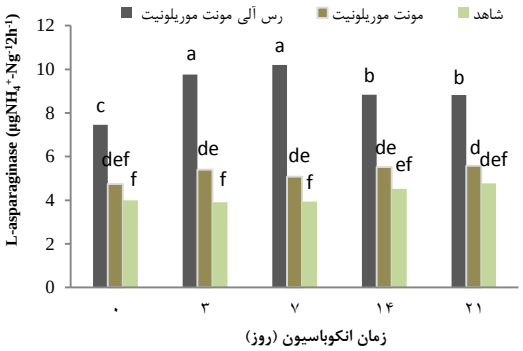


شکل ۷- فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز در خاک غیر سترون با گذشت مدت‌زمان انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد،

میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند

(SEM=۰/۱۷ ،MS_e=۰/۱۸)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۸- فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز 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 (MS_e=۰/۱۸، SEM=۰/۳۰)

بحث

رس‌های مونت موریلونیت ظرفیت تبادل کاتیونی بالایی دارند و به‌طور متداول حدود ۱۵۰-۸۰ میلی اکی والان در ۱۰۰ گرم است. چون ظرفیت تبادل کاتیونی آن‌ها بالا است 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 مونت موریلونیت ۸۹/۸ میلی اکی والان در ۱۰۰ گرم بود که با اصلاح این رس توسط سورفکتانت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم برومید 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 مونت موریلونیت 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 بااین‌حال به علت منافذ فراوان موجود در این مواد آلی امکان عبور بسترهها و همچنین خروج محصولات وجود دارد در نتیجه قادر به حفظ فعالیت خود هستند (Gianfreda *et al*., 1992; Burns *et al*.,1972; Pettit *et al*., 1976). 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 تشکیل‌شده 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, 1977; Nannipieri *et al*., 1978).

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 قابل‌توجهی حفظ نموده و تنها بخش بسیار ناچیزی از پایداری عملکرد آن پس از جذب بر سطوح این رس‌ها کاهش یافت (Cengiz *et al*., 2012).

نتیجه‌گیری

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

Archive of SID
www.SID.ir

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 انکوباسیون و شاهد در زمان صفر بود. به‌طورکلی با این تغییرات رس آلی تهیه‌شده می‌تواند به‌عنوان بستره مناسبی برای حفظ و نگهداری طولانی‌مدت آنزیم‌ها بدون کاهش فعالیت آن‌ها عمل کند و این تغییرات برای تهیه رس آلی مونت موریلونت 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.

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). Evaluaion 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). Intractions of soil minerals whith 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 Pohlan, 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 Enginering 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. *Siol 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*

Archive of SID

www.SID.ir

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 fi ngerprint 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 benzylation 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 hexadecyltrimethy-lammonium 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). Synrgistic 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.

Archive of SID

www.SID.ir