فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و ال‌گلوتامیناز درخاک‌های کشاورزی تحت‌تاثیرعلف‌کش آترازین

لیلا سلطانی[1]، فرشید نوربخش[2]
1- دانشجوی کارشناسی ارشد خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
2- دانشیار گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

lili_soltani63@yahoo.com

چکیده
میکروارگانیسم های خاک و فرآیندهایی که آنها تحت کنترل دارند، برای حمایت طولانی مدت از سیستم‌های کشاورزی بسیار اساسی هستند، بنابراین اثر آفت‌کش‌ها بر بیومس میکروبی خاک و فعالیت آنها اهمیت دارد. یکی از آفت‌کش‌هایی که به‌طور گسترده در ایران وجهان مورد استفاده قرار می‌گیرد، آترازین می‌باشد. در این تحقیق آترازین در غلظت‌های 1000-0/2 میلی‌گرم آترازین بر کیلوگرم به نمونه‌های خاک دو منطقه شرودان و جوزدان افزوده شد سپس نمونه‌های تیمار شده در 3 تکرار، به همراه خاک شاهد در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 50 درصد ظرفیت نگهداشت رطوبتی، در دو دوره زمانی 3 و 60 روز انکوباسیون شدند. طبق نتایج به‌دست آمده باافزایش غلظت آترازین و همچنین با گذشت زمان فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و ال-گلوتامیناز افزایش یافت. چنین به نظر میرسد سمیت آترازین بر این آنزیم ها زیاد شدید نبو ده و با گذشت زمان کاسته می گردد..
.

کلمات کلیدی: **آترازین، آنزیم ال -گلوتامیناز، آنزیم اوره‌آز.**

مقدمه

آترازین (2-کلرو-4- اتیل آمین -6- ایزوپروپیلامین- s- تریازین) علف‌کشی است که به طور گسترده برای کنترل علف-های هرز پهن‌برگ به خصوص در مزارع ذرت و سورگوم به کار می‌رود. این علف‌کش به علت کاربرد گسترده، نیمه‌عمر نسبتا طولانی و همچنین تحرک متوسط، در بخش‌های مختلف محیط زیست به ویژه در آب‌های سطحی مشاهده و کشف شده است[ونک و همکاران،1997]. وقتی ترکیبات آلی مصنوعی در اختیار میکروارگانیسم‌های خاک قرار می-گیرد ممکن است منابعی که آنها برای تامین مواد غذایی و انرژی استفاده می‌کنند تغییر کند، به‌خصوص اگر ماده آلی موجود در خاک اندک باشد و این ترکیبات قابلیت دسترسی زیستی داشته باشند[الکساندر،1994]. میکروارگانیسم‌های خاک قادرند آترازین را از طریق فرآیند N-دی‌آلکیلاسیون تجزیه کنند[هانی و همکاران،2002]. غلظت آترازین در خاک فاکتور بسیار مهمی است که تجزیه زیستی آترازین و پاسخ‌های میکروبی خاک را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد[زانتور وفلسوت، 1991]. در این مطالعه اثرغلظت و زمان کاربرد آترازین بر فعالیت میکروبی خاک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک: نمونه‌برداری از عمق 15-0 سانتی‌متری دو خاک آهکی واقع در مزرعه تحقیقاتی شرودان (تحت کشت ذرت) و جوزدان (تحت کشت جو) که هر دو در مناطق خشک با بارندگی متوسط 120 میلی-

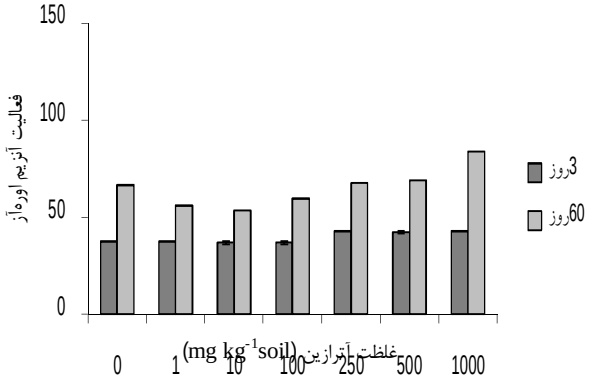
متروا‌قع شده‌اند انجام گرفت. نمونه‌های 100 گرمی خاک پس از عبور از الک 2 میلی‌متری در 3 تکرار انتخاب شدند و به‌وسیله غلظت‌های مختلف آتـرازین(1000، 500، 250، 100، 50، 10، 1، 0/6، 0/4و0/2 $mg\ kg^{-1}$) تیمارشـده و در ظروف پلاستیکی تریل قرار گرفتند و به همراه نمونه شاهد در دو دوره زمانی 3 و 60 روز در دمای 25 درجـه سـانتی-گراد و رطوبت 50 درصد ظرفیت نگهداشت رطوبتی انکوباسیون شدند.

فعالیت آنزیم اوره‌آز و ال-گلوتامیناز: فعالیت آنزیم اوره‌آز به روش فرانکنبرگر و برمنر[طباطبایی و برمنر،1972a] اندازه-گیری شد، به این ترتیب که نمونه‌های 5 گرمی خاک هواخشک شده با 0/2 میلی‌لیتر تولوئن و9 میلی‌لیتـر بـافرتریس (هیدروکسی متیل آمینو متان) با pH برابر 9 و با غلظت 0/05 مولار و 1 میلی‌لیتر از محلول اوره 0/2 مولار به عنـوان سوبسترا تیمار شدند. نمونه‌ها در دمای 37 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 2 ساعت درانکوباتور قـرار گرفتنـد. سـپس بـه وسیله محلول $KCl\text{-}Ag_2SO_4$ (2/5 مولارنسبت به KCl و 100میلی‌گرم نسبت به Ag_2SO_4)به حجم 50 میلـی‌لیتـر رسیدند. بلافاصله نیتروژن آمونیومی به روش تقطیر با بخار آب اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم برحسب $mg\ NH_4^+\text{-}N$ $kg^{-1}\ h^{-1}$ محاسبه گردید. فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نیز با روشی مشابه با آنزیم اوره‌آز اندازه‌گیری شد با این تفـاوت که از محلول 0/5 مولار ال-گلوتامین به عنوان سوبسترا استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری شـامل تجزیـه‌ی واریـانس داده‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار SAS و مقایسه‌ی میانگین‌هـا بـه کمـک آزمـون LSD در سـطح آمـاری 5 درصـد انجـام شد[فرانکنبرگر و طباطبایی،1991c].

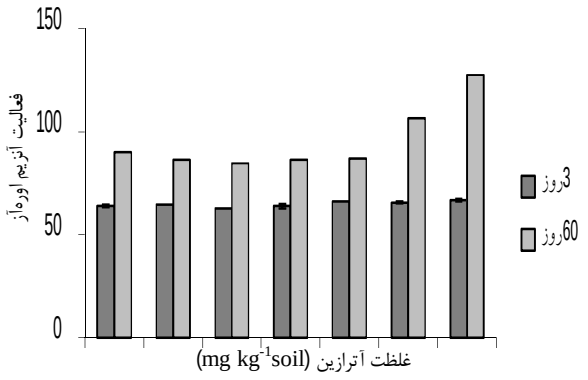
نتایج و بحث

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک شرودان در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های تعیـین شده، در شکل1 نشان داده شده است. فعالیت این آنزیم در خاک شرودان در غلظت‌های 100-0 $mg\ kg^{-1}$ ، پـس از گذشت3 روز تغییر نکرد، ولی فعالیت این آنزیم در غلظت250 $mg\ kg^{-1}$ افزایش یافـت وپـس ازآن تـا غلظـت 1000 $mg\ kg^{-1}$ ثابت ماند (شکل1). فعالیت این آنزیم در غلظت‌های کم آتـرازین(1و 10 میلـی‌گـرم آتـرازین بـر کیلـوگرم خاک)، پس از 60 روز، نسبت به خاک شاهدکاهش یافت ولی با افزایش غلظت آترازین از غلظت1000-100 میلی‌گـرم آترازین بر کیلوگرم خاک فعالیت اوره‌آز روند افزایشی نشان داد، به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنـزیم در غلظـت 1000 میلی‌گرم آترازین بر کیلوگرم خاک مشاهده شد(شکل1). در خاک جوزدان نیز با گذشت زمان از 3 بـه 60 روز در تمام سطوح آترازین، فعالیت اوره‌آز افزایش یافته است، به طوری‌که فعالیت این آنزیم پس از 60 روز بیشتر از 3 روز است(شکل2). مقایسه میانگین های فعالیت این آنزیم در زمان‌های 3 و60 روزه، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آترازین دراین خاک در شکل 2 نشان می‌دهد، پس از 3 روز اختلاف کمی در فعالیت آنزیم اوره‌آز درغلظت‌های مختلف وجـود د ارد. فعالیت اوره‌آز در غلظت‌های250-1 $mg\ kg^{-1}$ نسبت به خاک شاهد پس از گذشت 60 روز، کـاهش یافتـه ولـی فعالیت آنزیم دراین غلظت‌ها اختلاف بسیار اندکی نـشان داده اسـت، سـپس در غلظـت‌هـای 500 و 1000 $mg\ kg^{-1}$ فعالیت آنزیم اوره‌آز افزایش یافته و مقدار آن بیشتر از خاک شاهد شده است. در غلظت 1000 میلی‌گـرم آتـرازین بـر-کیلوگرم خاک بیشترین مقدار فعالیت مشاهده شد(شکل2). لایی و همکاران (1999) بیان داشتند اوره‌آز یکی از آنزیم-های درگیر با چرخه نیتروژن در خاک می‌باشد و می‌تواند برای نشان دادن تحولات بخش‌هـایی از چرخـه نیتـروژن در خاک مورد استفاده قرار گیرد. فعالیت اوره‌آز به سوبسترا وابسته است و با افزایش سوبـسترا فعالیـت آن افـزایش مـی-یابد[لایی و همکاران،1999]. علت این‌که پس از 60 روز انکوباسیون در غلظت‌های زیـاد آتـرازین فعالیـت ایـن آنـزیم

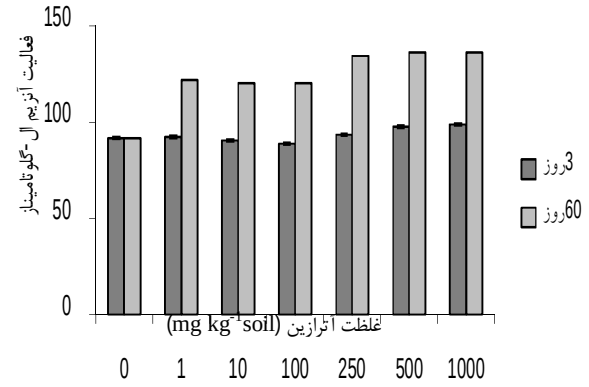
افزایش یافت می‌تواند تولید متابولیت‌های ناشی از تجزیه آترازین باشد که سوبستراهای ویژه برای این آنزیم بـه شـمار می‌آیند[هوت وهمکاران،1998] و پس از 60 روز در این غلظت‌های زیاد به اندازه کافی یافت می‌شوند.
مقایسه میانگین‌های آنزیم ال-گلوتامیناز در خاک شرودان در غلظت‌های مختلف و در زمان‌های معین نشان مـی‌دهـد، پس از 3 روز انکوباسیون در غلظت‌های کم آترازین، تفاوت معنی داری در فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز با خاک شـاهد وجود ندارد و پس از کاهشی که درغلظت 100 $mg\ kg^{-1}$ در فعالیت این آنزیم رخ می‌دهد، فعالیت آنزیم در غلظتهای 250-1000 $mg\ kg^{-1}$ روند افزایشی پیدا می‌کند و نسبت به خاک شاهد افزایش می‌یابد و بیشترین مقـدار فعالیـت در غلظت 1000 $mg\ kg^{-1}$ قابل مشاهده است. در زمان 60 روز فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در تمام غلظت‌ها نـسبت بـه خاک شاهد افزایش یافته است و بیشترین میزان فعالیت این آنـزیم در غلظـت‌هـای 500 و 1000 $mg\ kg^{-1}$ مـشاهده شده است(شکل3). مقایسه میانگین‌های فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در خاک جوزدان تحت تاثیر غلظت‌هـای مختلـف آترازین در زمان‌های معین در شکل 4، نشان می‌دهد، در هر دو زمان، فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در غلظت‌های اندک آترازین نسبت به خاک شاهد کاهش می‌یابد و در غلظت 1000 $mg\ kg^{-1}$ مقدار فعالیت از خاک شاهد بیشتر می‌شود. در این خاک گذشت زمان فقط بر غلظت‌های 1، 100 و 1000 $mg\ kg^{-1}$ تـاثیر گـذار بـوده و فعالیـت ایـن آنـزیم در غلظت‌های ذکر شده نسبت به زمان 3 روز افزایش یافته است، در حالی‌که فعالیت در سایر غلظت‌ها درزمان 3 و 60 روز تفاوت معنی‌داری ندارد(شکل4). آنزیم ال-گلوتامیناز یکی از آنزیم‌های مهم در فرآیند معدنی شدن نیتروژن می‌باشـد و مـی‌تـوان از آن بـه عنـوان شاخـصی بـرای تخمـین جمعیـت میکروبـی فعـال خـاک اسـتفاده نمـود[فرانکنبرگـر و طباطبایی،1991]. حجتی و نوربخش(2006) نشان دادند که فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز همبستگی زیادی با کربن آلی خاک دارد. این محققین دلیل افزایش فعالیت این آنزیم در حضور مقادیر زیاد کربن آلی را جذب مولکـول‌هـای آنـزیم توسط مواد آلی خاک و همچنین افزایش توده زنده میکروبی دانستند[حجتی و نـوربخش 2006]. عوامـل مختلفـی بـر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز اثر می‌گذارندکه از آن جمله می‌توان به عناصر سنگین، آفت‌کش‌ها و آلاینده‌های آلی اشاره کرد. فرانکنبرگر و طباطبایی(1991) با بررسی تاثیر فلزات سنگین بر آنزیم ال-گلوتامیناز نشان دادنـد کـه ایـن آنـزیم نسبت به فلزات سنگین حساس بوده و فعالیت آن کاهش می‌یابد[فرانکنبرگر وطباطبـایی،1991]. از تـاثیر علـف‌کـش آترازین بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در منابع گزارش مشخصی وجود ندارد.



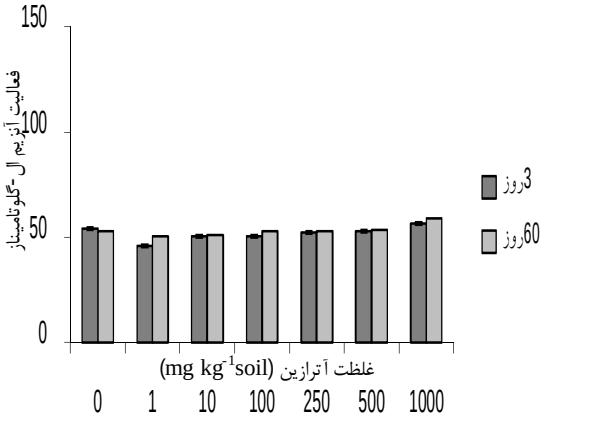
شکل1- فعالیت آنزیم اوره‌آز($mgNH_4^+$-N $kg^{-1}soil\ h^{-1}$)در خاک شرودان پس از 3 و 60 روز انکوباسیون در غلظت‌های مختلف آترازین



شکل2- فعالیت آنزیم اوره‌آز($mgNH_4^+$-N $kg^{-1}soil\ h^{-1}$)در خاک جوزدان پس از 3 و 60 روز انکوباسیون در غلظت‌های مختلف آترازین



شکل3- فعالیت آنزیم ال‌گلوتامیناز($mgNH_4^+$-N $kg^{-1}soil\ h^{-1}$) در خاک شرودان پس از 3 و 60 روز انکوباسیون در غلظت‌های مختلف آترازین



شکل4- فعالیت آنزیم ال‌گلوتامیناز($mgNH_4^+$-N $kg^{-1}soil\ h^{-1}$) در خاک جوزدان پس از 3 و 60 روز انکوباسیون در غلظت‌های مختلف آترازین

جدول1- تجزیه واریانس اثر زمان و غلظت آترازین بر فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک شرودان و جوزدان

منابع تنوع	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		آنزیم اوره‌آز	
		شرودان	جوزدان
زمان انکوباسیون	1	6916**	9942**
غلظت آترازین	6	240/9**	437/5**
اثر متقابل	6	98/45**	335/2**
خطای آزمایش	28	0/76	1/29
کل	41		

** معنی‌دار بودن در سطح 0/01 و * معنی‌دار بودن در سطح 0/05 را نشان می‌دهد.

جدول2- تجزیه واریانس اثر زمان و غلظت آترازین بر فعالیت آنزیم‌ال‌گلوتامیناز در خاک شرودان و جوزدان

منابع تنوع	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		ال‌گلوتامیناز	
		شرودان	جوزدان
زمان انکوباسیون	1	9293**	33/45**
غلظت آترازین	6	494**	50/56**
اثر متقابل	6	288/9**	3/54*
خطای آزمایش	28	1/06	0/91
کل	41		

** معنی‌دار بودن در سطح 0/01 و * معنی‌دار بودن در سطح 0/05 را نشان می‌دهد.

Alexander, M. 1994. Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, San Diego, USA.

Dzantor, E.K., Felsot, A.S., 1991. Microbial responses to large concentrations of herbicides in soil. Environ. Toxicol. Chem. 10, 649–655.

Frankenberger, W. T. and Tabatabai, M. A. 1991. Factors affecting L-glutaminase activity in soils. Soil. Biol. Biochem. 23: 875-879.

Frankenberger, W. T., Jr. and Tabatabai, M. A.1991c. L-Glutaminase activity of soils. Soil Biol. Biochem. 23: 869-874.

Haney. R. L., Senseman, S. A., Krutz, L. J. and Hons, F. M. 2002. Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. Biol. Fertil. Soil. 35: 35-40.

Hojjati, S. and Nourbakhsh, F. 2006. Enzyme activities and microbial biomass carbon in a soil amended with organic and inorganic fertilizers. J. Agron. 5: 563-569.

Houot, S., Barriuso, E. and Bergheaud, V.1998. Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendment. Soil Biol. Biochem. 30: 2147-2157.

Lai. K. M., Ye, D. Y. and Wong, J. W.1999. Enzyme activities in a sandy soil amended with sewage sludge and coal fly ash. Water. Air. Soil Poll. 113: 261-272.

Tabatabai. M. A. and Bremner, J. M.1972a. Assay of urease activity in soils. Soil Biol. Biochem. 4: 479-487.

Wenk, M., Bourgeois, M., Allen, J. and Stucki, G., 1997. Effects of atrazine-mineralizing microorganisms on weed growth in atrazine-treated soils. J. Agric. Food Chem. 45: 4474-4480.

Knuiman MW and Laird NM, 1990. Parameter estimation in variance component models for binary response data. Pp. 177-189. In: Gianola D and Hammond K (eds). Advances in statistical methods for genetic improvement of livestock. Springer- Verlag.