بررسی روند تغییرات تنفس پایه، تنفس ناشی از بستره و فعالیت آنزیمهای اوره‌آز و نیترات‌رداکتاز خاک در انکوباسون آن با سطوح مختلف سرب

ناصر شیرزاده، ناصرعلی‌اصغرزاد، نصرت‌اله نجفی
گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
N.Shirzad.agr@gmail.com

چکیده
سرب می‌تواند اکولوژی میکروبی و سلامت خاک را به مخاطره اندازد. به این منظور، سطوح مختلف سرب با غلظت‌های 0، 100، 200، 300، 400 و 500mg/kg از منبع نیترات سرب به خاک اضافه شده و در دوره‌های زمانی 3، 15، 30 و 90 روز تنفس پایه، تنفس تحریک شده با بستره و فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و نیترات‌رداکتاز اندازه‌گیری شدند. در روزهای نخست در غلظت‌های پایین شاخص‌های مورد اندازه‌گیری ابتدا مقداری افزایش نشان دادند ولی در غلظت‌های بالاتر از آن کاهش معنی‌داری مشاهده شد. در روزهای 30 و 90 بعد از آلودگی، با افزایش میزان آلودگی برخی شاخص‌ها کاهش یافتند ولی برخی دیگربه دلیل ایجاد تحمل در جامعه میکروبی ثابت ماندند.

کلمات کلیدی: آلودگی سرب، تنفس میکروبی، سلامت خاک، فعالیت آنزیمی

مقدمه
فعالیت‌های آنزیمی می‌توانند فعالیت میکروبی خاک را منعکس کنند. همچنین این فعالیت‌ها به تغییرات ایجاد شده توسط تنش‌های طبیعی و انسانی مانند افزایش فلزات سنگین بسیار حساس هستند. بنابراین مطالعه تأثیر آلودگی فلزات سنگین بر فعالیت‌های آنزیمی خاک برای درک بیشتر تأثیر آنها بر کیفیت و حاصلخیزی خاک اهمیت زیادی دارد (زینگ و همکاران، 2007). آنزیم اوره‌آز از جمله آنزیم‌های خارج سلولی است که مرتباً به وسیله میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود و در هیدرولیز اوره و تبدیل آن به آمونیوم نقش دارد. حساسیت فعالیت آنزیم اوره‌آز در برابر آلاینده‌ها در بسیاری از موارد نسبت به سایر آنزیم‌های خاک بیشتر است (بات و همکاران 1989). آنزیم نیترات‌رداکتاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در دنیتریفیکاسیون است. دنیتریفیکاسیون یک فرایند انرژی‌خواه است که میکروارگانیسم‌ها در شرایط بی‌هوازی از نیترات به عنوان یک پذیرنده الکترون استفاده می‌کنند. پیش‌بینی شده که بیش از 50% میکروارگانیسم‌ها در این فرایند به نوعی دخیل هستند. تنفس تحریک شده با بستره که بیانگر جمعیت فعال میکروبی در خاک می‌باشد، به شدت تحت تأثیر آلایندهها قرار می‌گیرد. هدف این تحقیق، که به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرارانجام شد، بررسی تأثیرپذیری شاخص‌های میکروبی در زمانهای مختلف انکوباسیون آنها با سطوح مختلف سرب بود.

مواد و روش‌ها
1- نمونه‌برداری و اعمال تیمارها
نمونه خاک مورد مطالعه، از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان تبریز برداشته شد و از الک 4 میلی‌متری رد شد. بعد از به تعادل رساندن جمعیت میکروبی، سطوح سرب با غلظت‌های 0، 100، 200، 300، 400 و 500mg/kg از منبع نیترات سرب به نمونه‌های خاک در دو تکرار اضافه شده و به مدت 90 روز در دمای 25 درجه سانتیگراد و رطوبت معادل با

10- کیلوپاسکال انکوباسیون شد (دیاز-راوینا و بت، 1996) و در زمانهای 3، 15، 30 و 90 روز شاخص‌های میکروبی اندازه‌گیری شدند.

2- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز

در 4 ارلن 100 میلی‌لیتری هر کدام 5 گرم خاک مرطوب مزرعه ریخته و پس از اضافه کردن محلول بستره و بافر بورات نمونه‌ها به مدت دو ساعت در دمای 37 درجه انکوباسیون شدند. بعد از انکوباسیون مقدار 30 میلی‌لیتر محلول کلرید پتاسیم به هر یک از ارلن‌ها افزوده شده و 30 دقیقه توسط همزن دورانی، به هم زده شد و بعد ارلن‌ها صاف شدند و با استفاده از روش واکنش برتلات، آمونیوم استخراج شده در این مدت، اندازه‌گیری شد (زانتوا و برمنر 1975).

3- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز

پنج گرم خاک مرطوب مزرعه درون لوله آزمایش ریخته شده و پس از اضافه کردن محلول 2و4- دی‌نیتروفنل، محلول بستره و آب مقطر، نمونه‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 25 درجه انکوباسیون گردیدند. بعد از انکوباسیون، به هر یک از لوله‌ها مقدار 10 میلی‌لیتر محلول کلرید پتاسیم ریخته و محلولها صاف شده و مقدار جذب در طول موج 520 نانومتر در مقابل محلول شاهد و استانداردهای نیتریت، اندازه‌گیری شدند (عبدالمجید و طباطبایی1987).

4- تنفس پایه

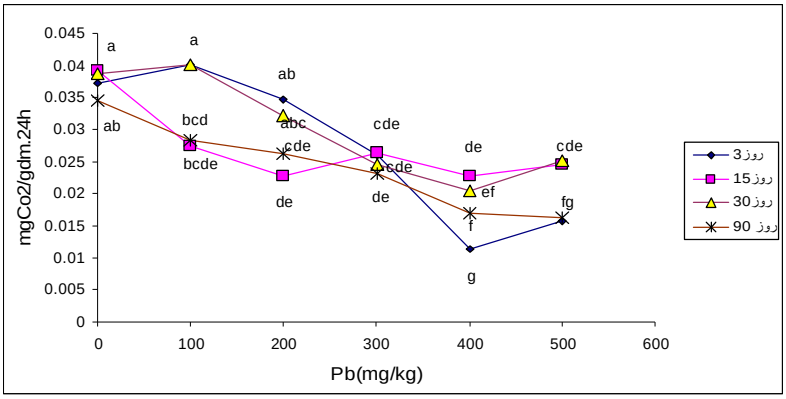
بیست گرم خاک مرطوب مزرعه به داخل ظروف شیشه‌ای مخصوص در 4 تکرار ریخته شده و بالون‌های حاوی 20 میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم0/1 مولار در داخل این ظروف قرار داده شده و درپوش ظروف بسته شده و به مدت 24 ساعت در دمای 25 درجه انکوباسیون شدند. بعد از اتمام انکوباسیون، با افزودن محلول کلرید باریوم، CO_2 جذب شده توسط سود، به صورت کربنات باریم رسوب داده شده و باقیمانده هیدروکسید سدیم با اسید 0/1HCl مولار تیتر شد. برای تهیه شاهد همان مراحل بدون خاک انجام شد (ایزرمایر و وست،1952 اصلاح شده توسط جاجی،1976).

5- تنفس ناشی از بستره

شصت میلی‌گرم گلوکز به 20 گرم خاک مرطوب مزرعه اضافه شده و نمونه‌ها به مدت دو ساعت در دمای 22 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به مدت 4 ساعت در داخل ظروف سربسته حاوی سود 0/1 مولار انکوباسیون و بعد از این مدت آماده تیتراسیون شدند. مراحل تیتراسیون، همانند تیتر تنفس پایه بود(ایزرمایر و وست، 1952).

نتایج و بحث

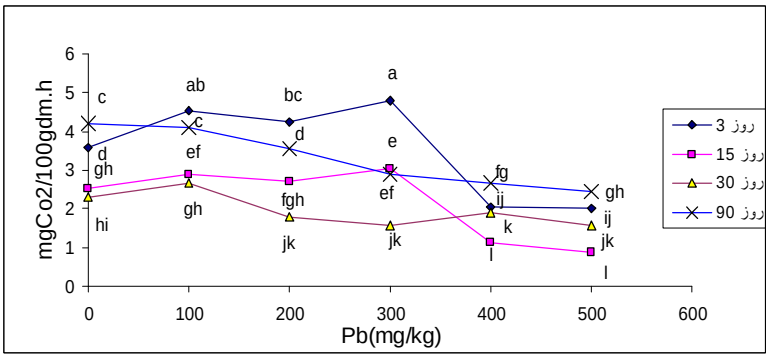
1- تنفس پایه در روز سوم بعد از آلودگی با افزایش میزان آلودگی خاک مقداری افزایش یافت ولی این افزاش معنی‌دار نبود. از غلظت 200mg/kg سرب به بالا میزان تنفس پایه بشدت کاهش یافت(شکل 1)



شکل 1- روند تغییرات تنفس پایه در انکوباسیون خاک با سطوح مختلف سرب در 4 دوره زمانی

در روز 15 میزان تنفس پایه تا 100mg/kg کاهش یافت و بعد از آن تا 500mg/kg تغییرات معنی داری مشاهده نشد در روز 30 میزان تنفس پایه با افزایش غلظت بطور معنی‌داری کاهش یافت. در روز 90 هم این شاخص با افزایش آلودگی کاهش یافت و لی این کاهش نسبت به دوره‌های زمانی قبلی شدت کمتری داشت و با شیب کمتری مشاهده شد که احتمالاً به دلیل مقاوم شدن میکروارگانیسم ها در برابر آلودگی سرب باشد. در هیچ یک از دوره های زمانی تغییرات معنی داری بین غلظتهای 400 و500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک مشاهده نشد.

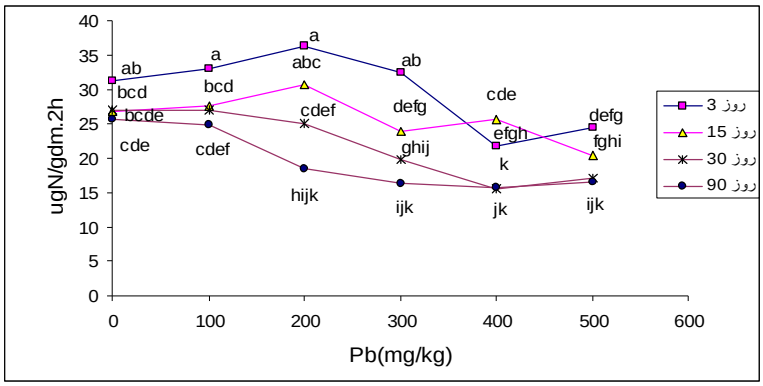
2- تنفس ناشی از بستره در روز سوم، با افزایش غلظت تا 300mg/kg افزایش معنی‌داری نشان داد ولی از غلظت 300mg/kg به بالا این شاخص به شدت کاهش یافت(شکل 2).



شکل 2- روند تغییرات تنفس ناشی از بستره در انکوباسیون خاک با سطوح مختلف سرب در 4 دوره زمانی

در روز 15، تا غلظت 100 mg/kg افزایش معنی‌داری در تنفس ناشی از بستره مشاهده شد و تا 300mg/kg تفاوت معنی‌دار نبود ولی در بالاتر از آن به شدت کاهش یافت. در روز 30، از 200 mg/kg به بعد تنفس بستره کاهش معنی‌داری یافت و تا غلظت 500 mg/kg تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. در روز 90 تا غلظت 100 mg/kg کاهش معنی‌دار نبود ولی از این غلظت به بعد با افزایش میزان آلودگی تنفس بستره به ملایمت کاهش یافت. در هیچ یک از دوره‌های زمانی تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های 400 و 500mg/kg مشاهده نشد. . افزایش تنفس در روزهای نخست میتواند به دلیل تحریک میکروبها بر اثر اعمال آلودگی باشد که این تحمل در غلظتهای پایین مشاهده می‌شود و در غلظتهای بالا احتمالاً به دلیل از بین رفتن میکروارگانیسم‌ها تنفس کاهش می‌یابد

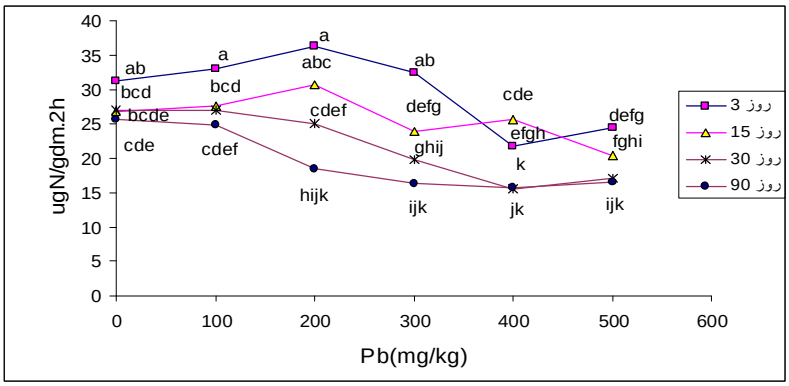
3- فعالیت آنزیم اوره‌آز در روزهای سوم و 15 تا غلظت 200mg/kg خاک به مقدار جزئی افزایش یافت ولی این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل3).



شکل 3- روند تغییرات فعالیت انزیم اوره‌آز در انکوباسیون خاک با سطوح مختلف سرب در 4 دوره زمانی

از غلظت 200 mg/kg به بالا، فعالیت این آنزیم کاهش یافت که تا غلظت 500mg/kg ادامه داشت. در روز 30، از غلظت 300mg/kg و در روز 90 از غلظت 200mg/kg کاهش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم مشاهده شد.

4- فعالیت آنزیم نیترات‌رداکتاز در روز سوم، با افزایش غلظت تا 200mg/kg افزایش یافت سپس کاهش معنی‌داری از غلظت‌های 300 mg/kg به بعد مشاهده شد ودر غلظت 500 mg/kg به کمترین مقدار خود رسید. در روز 15 تا غلظت 100 mg/kg فعالیت آنزیم نیترات‌رداکتاز افزایش یافت و بعد از آن تا غلظت 300 mg/kg کاهش شدیدی نشان داد و از این غلظت به بعد تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. در روز 30 کاهش فعالیت نیترات‌رداکتاز از غلظت 300 mg/kg شروع شد و تا 500 mg/kg ادامه داشت. در روز 90 فعالیت این آنزیم تا غلظت 300mg/kg روند کاهشی آهسته‌تری داشت ولی بعد از این غلظت فعالیت به شدت کاهش یافت (شکل 4).



شکل 4- روند تغییرات فعالیت انزیم نیترات‌رداکتاز در انکوباسیون خاک با سطوح مختلف سرب در 4 دوره زمانی

در روزهای نخست و غلظتهای پایین، همانند تنفس، فعالیت آنزیمی مقداری افزایش می‌یابد ولی با افزایش غلظت و مرگ میکروارگانیسم‌ها فعالیت آنزیمی به شدت کاهش می‌یابد. با افزایش زمان انکوباسیون، آلودگی در سطوح پایین هم اثر خود را گذاشته و افت فعالیت آنزیمی در غلظتهای پایین‌تری مشاهده می‌شود.

منابع

علی‌اصغرزاد، ن.، 1385. روشهای آزمایشگاهی در بیولوژی خاک (ترجمه)، انتشارات دانشگاه تبریز.

Abdelmagid, H.M., Tabatabai, M.A. 1987. Nitrate reductase activity of soils. Soil Biol Biochem, 19: 421-427.

Bååth, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial process and populations careviews. Water Air Soil Polluttion, 47: 335-379.

Diaz-Ravina, M., Bååth, E. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. Appli. and Environ. Microbiol, 62: 2970-2977.

Fu, M.H., Tabatabai, M.A., 1989. Nitrate reductase activity in soils: Effects of trace elements. Soil Biol. and Biochem, 21: 943-946.

Isermeyer, H., 1952. Eine einfache Methode zur Bestimmang der Bodenatmung und der Carbonate im Boden. Z Pflanzenernaehr Bodenkd, 56: 26-38.

Zantua, M.I., Bremner, J.M. 1975. Comparison of methods of assaying urease activity in soils. Soil Biol and Biochem, 7: 291-295.

Zeng, L.S., Liao, M., Chen, C.L., and Huang, C.Y. 2007. Effects of lead contamination on soil enzymatic activities, microbial biomass, and rice physiological indices in soil-lead-rice (Oryza sativa L.) system. Ecotoxi. and Environ. Safety. 67, 67-74.