# بررسی برهمکنش کیتوزان با سرب بر فعالیت آنزیم‌ها در دو خاک اسیدی و آهکی

سعیده افروغ[1] و فرشید نوربخش

دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان؛ **saeede.afrough@gmail.com**

استاد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان؛ **farshid@cc.iut.ac.ir**

دریافت: **99/6/3** و پذیرش: **1400/3/19**

## چکیده

**کیتوزان پلیمری طبیعی و تخریب‌پذیر متشکل از واحدهای گلوکز آمین است که با داشتن گروه‌های عاملی واکنشی می‌تواند فراهمی فلزهای سنگین را برای آنزیم‌های خاک که شناسه‌ای از کیفیت خاک هستند، کاهش دهد. با این حال، آگاهی‌های اندکی از تأثیرپذیری آنزیم‌های خاک در حضور هم‌زمان کیتوزان و فلزهای سنگین در دسترس است. در این پژوهش تأثیر برهم‌کنش کیتوزان در سه سطح شاهد (نبود کیتوزان)، کیتوزان با وزن مولکولی کم (LMC) و کیتوزان با وزن مولکولی زیاد (HMC) با سرب در سه سطح صفر، 50 و 500 میلی‌گرم در کیلوگرم بر غلظت سرب فراهم و فعالیت آنزیم‌های اسید و آلکالین فسفاتاز، ال-گلوتامیناز و هیدرولیز فلورسین دی استات در دو خاک متفاوت (لورک و لنگرود) بررسی و نتایج از نظر آماری مقایسه شدند. هر دو نوع کیتوزان غلظت سرب فراهم را در هر دو خاک به‌طور چشمگیری کاهش داد ولی HMC مؤثرتر بود. در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان در حضور سرب فعالیت آنزیم‌های اسید فسفاتاز، آلکالین فسفاتاز، ال-گلوتامیناز و هیدرولیز فلورسین دی استات را نسبت به شاهد به‌طور چشمگیری افزایش داد. در خاک لنگرود کاربرد HMC در حضور سرب، سبب افزایش فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز شد، ولی بر فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز، آلکالین فسفاتاز و هیدرولیز فلورسین دی استات تأثیر نداشت. کاربرد HMC در خاک لنگرود نسبت به شاهد تأثیر چشمگیری بر فعالیت آنزیم‌ها نداشت. سطح 50 میلی‌گرم در کیلوگرم سرب در حضور کیتوزان فعالیت اسید فسفاتاز در خاک لورک و هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لنگرود را نسبت به شاهد کاهش داد ولی بر فعالیت آنزیم‌های ال-گلوتامیناز و آلکالین فسفاتاز تاثیر مثبت داشت. سطح 500 میلی‌گرم در کیلوگرم سرب در حضور کیتوزان نیز فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز در خاک لورک و هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لنگرود را کاهش ولی فعالیت دیگر آنزیم‌ها را افزایش داد. به‌طورکلی، در پی افزودن هم‌زمان کیتوزان و سرب به خاک، افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌ها بستگی به نوع آنزیم، کیتوزان و غلظت فلز داشت.**

**واژه‌های کلیدی:** خاک آهکی یا اسیدی، فعالیت آنزیمی، فلز سنگین، کیتوزان

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی

**مقدمه**

باتوجه به صنعتی شدن جوامع انسانی، غلظت فلزهای سنگین در خاک به‌شدت رو به افزایش است. فلزهای سنگین آلاینده‌های تخریب ناپذیر محیط زیست هستند که اثرات نامطلوبی بر سلامت اکوسیستم‌های طبیعی دارند. سرب از گروه فلزهای سنگینی است که برای هیچ یک از کارکردهای زیستی نیاز نیست (ووانا و اوکییمن، 2011). عناصر سنگین در غلظت‌های پایین سرطان‌زا هستند و انباشتگی این عناصر در محلول خاک موجب اختلال در رشد گیاهان و فرایندهای زیستی در خاک می‌شود. فلزهای سنگین از منابع طبیعی و فعالیت‌های انسانی وارد خاک می‌شوند. تاکنون روش‌های گوناگونی برای حذف آلاینده‌ها استفاده شده که شامل انعقاد، همرسوبی، اکسیداسیون، ته نشینی، تبادل یونی، جذب سطحی، نانو فیلتراسیون، اسمز معکوس، زیست بهسازی، استخراج با حلال، و غیره است (ژانگ و همکاران، 2016). تثبیت فلزهای سنگین در خاک روشی سازگار با محیط‌زیست است زیرا روش‌هایی که بر پایه حذف و یا انتقال فلز سنگین باشند سبب آلودگی محیط‌زیست می‌شوند. تثبیت فلزهای سنگین در خاک با مواد زائد ساخته‌شده در صنعت و کشاورزی، یک روش ارزان برای پاک‌سازی خاک بشمار می رود. استفاده از مواد طبیعی مانند کیتوزان و بیوچار در مناطق آلوده به فلزهای سنگین در این سال‌ها به دلیل وفور منابع در دسترس و ارزان بودن مورد توجه قرار گرفته است (سوگا، 2001). گزینش روش‌های بهسازی خاک به عوامل گوناگونی ازجمله ماهیت آلاینده‌ها، زمین‌شناسی و نوع خاک، ویژگی‌های منطقه آلوده، هزینه و زمان پاک‌سازی بستگی دارد (لیو و همکاران، 2018).

کیتوزان پلیمری طبیعی دارای کربن و نیتروژن، متشکل از واحدهای گلوگز آمین یکی از مشتقات کیتین است. کیتوزان توسط برخی گونه‌های قارچی نیز تولید می‌گردد. این ترکیب دارای ویژگی‌های منحصربه‌فرد زیستی مانند ضد اکسیداسیون، ضد حساسیت، ضد باکتری و ضد ویروس است. کیتوزان دارای گروه‌های عاملی واکنش دهنده است که می‌توانند سبب کلات کنندگی فلزهای سنگین شوند (تریپاتی و همکاران ، 2017). سه نوع گروه‌های عاملی واکنش دهنده کیتوزان شامل: گروه‌های آمینه در موقعیت کربن شماره دو (C-2)، گروه استامید در موقعیت کربن شماره سه (C-3) و گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت کربن شماره شش (C-6) است (نگو و همکاران، 2015). کیتوزان‌های ساخته شده بر پایه وزن مولکولی به سه گروه شامل کیتوزان با وزن مولکولی کم (16 تا 190 کیلو دالتون)، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (190 تا 300 کیلو دالتون) و کیتوزان با وزن مولکولی زیاد (بیشتر از 300 کیلو دالتون) تقسیم می‌شوند (کاماری و همکاران، 2011).

سنجش فعالیت آنزیم‌های خاک برای ارزیابی تأثیرات کوتاه مدت یا بلندمدت آلاینده‌های گوناگون ازجمله فلزهای سنگین در خاک مورد استفاده قرار می‌گیرد. افزون بر این، فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند برای نشان دادن اثر فرآیندهای احیای اکوسیستم‌ها یا بازتاب کیفیت خاک پس از بازسازی محیط خاک که توسط فرایندهای صنعتی آسیب دیده است، استفاده شود (سیارکوفسکا ، 2015). هرگونه تغییرات مدیریتی خاک در زمان کوتاهی درتوده‌ی زنده میکروبی و آنزیم‌های خاک منعکس می‌شوند پیش از آن‌که در مواد آلی تغییرات قابل‌اندازه‌گیری دیده شود. فعالیت آنزیم‌های خاک به‌عنوان شاخص‌های اولیه‌ی مناسب ویژگی‌های خاک، به دلیل پاسخ سریع آن‌ها به شیوه‌های مدیریت خاک، ارتباط آن‌ها با بخش زنده‌ی خاک و سهولت اندازه‌گیری، به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. فعالیت آنزیم‌های خاک برای سرعت بخشیدن به یک شبکه‌ی پیچیده از واکنش‌های بیوشیمیایی لازم برای وقوع فرایندهای زیستی از قبیل تجزیه‌ی بقایای آلی و تشکیل مولکول‌های جدید، چرخه‌ی عناصر غذایی و تامین مقادیر مناسب از ذخایر عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، ضروری است (اکنلر و

طباطبایی ، 2004). به عنوان مثال، اندازه‌گیری هیدرولیز فلورسین دی استات، یک شاخص جایگزین برای اندازه‌گیری فعالیت‌های گروهی از آنزیم‌ها در خاک است. فلورسین دی استات ترکیبی نسبتاً غیر قطبی است که فرض می‌شود به‌سادگی از غشاء یاخته عبور نماید. هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک توسط تعدادی از آنزیم‌ها ازجمله لیپازها، پروتئازها، استرازها و دیگر آنزیم‌های برون سلولی تولیدشده توسط جامعه میکروبی، به‌طور غیراختصاصی صورت می‌گیرد. محصول واکنش، فلورسین است که با روش اسپکتروفتومتری قابل اندازه‌گیری است. ازآنجاکه هیدرولیز فلورسین دی استات فرایند گسترده‌ای از فعالیت هیدرولازهای خاک است، می‌تواند نمایانگر فعالیت‌های میکروبی باشد و نشانگر کیفیت عمومی محیط‌زیست میکروبی خاک است (پراسر و همکارن، 2011).

با توجه به فقدان اطلاعات درباره تأثیر کیتوزان بر سطح بازدارندگی که ممکن است فلزهای سنگین بر آنزیم‌های خاک بکار روند، این پژوهش با هدف بررسی برهمکنش کیتوزان و سرب بر فعالیت آنزیم‌های اسید و آلکالین فسفاتاز، ال-گلوتامیناز و هیدرولیز فلورسین دی استات در دو خاک با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری و تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌ها

نمونه‌برداری به‌صورت مرکب از عمق 0-15 سانتی‌متری دو منطقه لنگرود (استان گیلان) و لورک (استان اصفهان) زیر کشت چای و جو انجام گرفت. پس از هوا خشک کردن و گذراندن خاک‌ها از الک دو میلی‌متری، برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (برت ، 2004). بافت خاک به روش پیپت، مقدار pH و قابلیت هدایت الکتریکی در سوسپانسیون یک به 2/5 خاک به آب، کربن آلی به روش اکسیداسیون تر، نیتروژن کل به روش کلدال و کربنات کلسیم معادل به روش خنثی سازی اسید و تیتراسیون برگشتی با سود در حضور معرف فنول فتالئین در خاک‌ها اندازه‌گیری شدند. کربن آلی کیتوزان نیز به روش اکسیداسیون تر اندازه‌گیری شد (بارت، 2004).

### انکوباسیون

برای این کار از خاک‌های برداشت شده نمونه‌های 400 گرمی آماده شد. نمونه‌های 400 گرمی با سرب در سه سطح صفر، 50 و 500 میلی‌گرم فلز در کیلوگرم خاک تیمار شدند. از نمک استات سرب برای آلوده کردن خاک‌ها استفاده شد. نمونه‌های تیمارشده با سرب، برای یک ماه در رطوبت 50 درصد ظرفیت نگهداری آب[1] در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گذاشته شدند. پس از پایان یک ماه انکوباسیون نمونه‌ها از انکوباتور بیرون و هریک از نمونه‌های 400 گرمی بالا به چهار نمونه 100 گرمی تقسیم شد. این چهار نمونه به ترتیب نمونه‌ها با کیتوزان با وزن مولکولی زیاد[2] (به میزان صفر و 10 گرم کربن برکیلوگرم خاک) و کیتوزان با وزن مولکولی کم[3] (به میزان صفر و 10 گرم کربن برکیلوگرم خاک) تیمار و دوباره برای 15 روز در انکوباتور نگهداری شدند.

پس از پایان انکوباسیون، غلظت سرب فراهم و فعالیت آنزیم‌های اسید فسفاتاز، آلکالین فسفاتاز، ال-گلوتامیناز و سرعت هیدرولیز فلورسین دی استات در تیمارها به شرح زیر اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری سرب فراهم

برای عصاره‌گیری سرب از خاک از دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید-تری اتانول آمین[4] (DTPA-TEA) استفاده شد. غلظت سرب در عصاره توسط دستگاه جذب اتمی خوانده شد (اسپارکس و همکاران، 1996).

---

1. Water holding capacity
2. High molucular chitosan
3. Low molucular chitosan
4. Diethylene triamine pentaacetic acid-triethanolamine method (DTPA-TEA)

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها**

برای سنجش فعالیت اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز از روش طباطبایی (1994) استفاده شد. در این روش پارانیتروفنل فسفات (PNP) آزاد شده در یک ساعت انکوباسیون خاک در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با تولوئن و محلول بافر MUB[1] (pH بافر برای اسید فسفاتاز در 6/5 و برای آلکالین فسفاتاز در 11) به شیوه رنگ‌سنجی در طول موج420 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. تیمار سود-کلرید کلسیم (pH=10) جهت توقف فعالیت آنزیم به محلول خاک بالا افزوده شد. شاهد تیماری است که قبل انکوباسیون سوبسترا دریافت نکرد و پس از پایان انکوباسیون و افزودن متوقف کننده سوبسترا دریافت نمود. از تفاضل تیمار شاهد و تیمار اصلی فعالیت آنزیم محاسبه گردید (طباطبایی، 1994).

برای سنجش هیدرولیز فلورسین دی استات با روش رنگ‌سنجی، فلورسین آزاد شده در طول موج 490 نانومتر پس از سه ساعت انکوباسیون خاک در دمای 37 درجه سانتی گراد با بافر تریس (pH=7/6) و سوبسترای فلورسین دی استات اندازه‌گیری شد. تیمار استون پس از انکوباسیون برای توقف فعالیت آنزیم‌ها (استون بطور کامل فعالیت را متوقف نمی‌کند) به نمونه‌ها اضافه شد. تیمار شاهد قبل از انکوباسیون به‌جای سوبسترا، استون دریافت نمود و در پایان انکوباسیون پس از افزودن استون، سوبسترا نیز دریافت نمود (گرین و همکاران، 2006؛ پراسر و همکارن، 2011).

سنجش فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نیز بر اساس اندازه‌گیری آمونیوم آزاد شده از محلول خاک با بافر تریس (pH=10)، سوبسترای گلوتامین و تولوئن در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت بود. آمونیوم آزاد شده در نتیجه تیمار نمونه‌های خاک انکوباسیون شده با اسید کلریدریک دو مولار (جهت توقف فعالیت آنزیمی) و تقطیر بخار یک حجم معین از سوسپانسیون خاک به دست آمده با MgO به مدت چهار دقیقه اندازه‌گیری شد. تیمار گواه قبل از انکوباسیون سوبسترا دریافت نکرد و پس از پایان انکوباسیون و افزودن متوقف کننده سوبسترا دریافت نمود (طباطبایی، 1994).

**تجزیه و تحیل آماری**

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل فاکتور سرب (در سه سطح صفر، 50 و 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و فاکتورکیتوزان (در سه سطح شاهد یا بدون کیتوزان (C)، کیتوزان با وزن مولکولی بالا (HMW) کیتوزان با وزن مولکولی کم (LMW)) در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج به کمک نرم افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel صورت گرفت.

## نتایج

**ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه**

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌های مورد مطالعه در جدول 1 نشان داده شده است. هر دو خاک از نظر کربن آلی متوسط بودند. خاک لنگرد اسیدی و غیرآهکی بود ولی خاک لورک تقریباً خنثی و آهکی بود. غلظت سرب در خاک لنگرود 0/04 و در خاک لورک 1/7 میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. بافت خاک لنگرود لوم رسی شنی ولی خاک لورک لوم رسی سیلتی بود. با توجه به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، خاک لورک از وضعیت مناسب‌تری برای فعالیت جامعه میکروبی برخوردار بود.

[1] Modified universal buffer

**جدول 1- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده در خاک‌های مورد مطالعه**

| خاک | بافت | سیلت | رس | کربن آلی | نیتروژن کل | کربنات کلسیم معادل | رطوبت اشباع | سرب فراهم | pH† | †قابلیت هدایت الکتریکی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | (g/kg) | | | | | | (mg/kg) | | (dS/m) |
| لورک | لوم رسی سیلتی | 450 | 380 | 17 | 1/1 | 383/3 | 490 | 1/7 | 7/2 | 0/7 |
| لنگرود | لوم رسی شنی | 222 | 212 | 25 | 1/4 | ناچیز | 420 | 0/04 | 4/6 | 0/14 |

† pH و قابلیت هدایت الکتریکی در سوسپانسیون 1 به 2/5 خاک به آب اندازه‌گیری شدند.

**اثر کیتوزان بر غلظت سرب فراهم در خاک**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی کیتوزان در سطح احتمال پنج درصد، اثر اصلی سرب و برهم‌کنش کیتوزان و سرب بر غلظت سرب فراهم در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 2). در خاک لنگرود نیز اثرات اصلی کیتوزان، سرب و برهم‌کنش آن‌ها بر غلظت سرب فراهم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول3). در شکل 1 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر غلظت سرب فراهم در دو خاک لورک و لنگرود نشان داده شده است. در سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک کاربرد هر دو نوع کیتوزان سبب کاهش معنی‌دار غلظت سرب قابل عصاره‌گیری نسبت به تیمار شاهد در هر دو خاک لورک و لنگرود شد. در هر دو خاک اثر کیتوزان با وزن مولکولی زیاد بر کاهش غلظت سرب فراهم بیشتر از کیتوزان با وزن مولکولی کم بود. در سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم، غلظت سرب فراهم در تیمار شاهد دو خاک لنگرود و لورک به ترتیب 494/7 و 422/2 میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که با افزودن کیتوزان با وزن مولکولی کم به ترتیب به 379/5 و 267/7 میلی‌گرم بر کیلوگرم و با افزودن کیتوزان با وزن مولکولی زیاد به 314/6 و 228/4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش پیدا کرد.

**جدول 2- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری شده و غلظت سرب فراهم در خاک لورک**

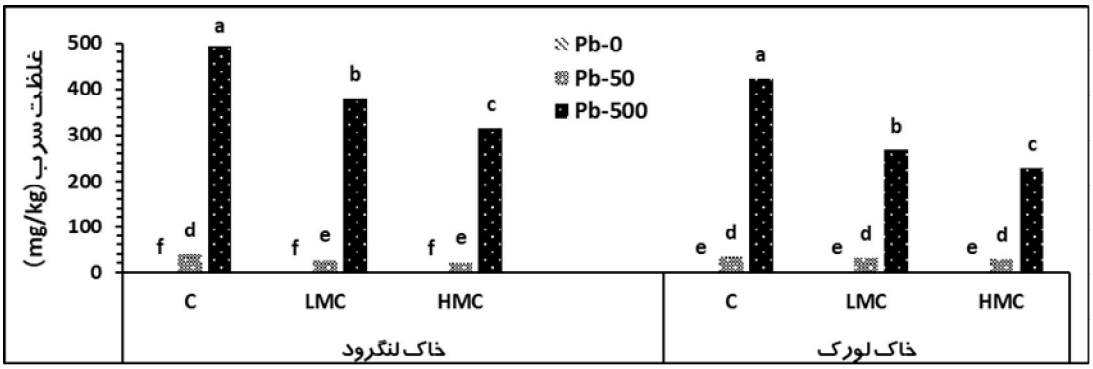
| منابع تغییرها | درجه آزادی | میانگین مربع‌ها | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | غلظت سرب فراهم | اسید فسفاتاز | هیدرولیز فلورسین دی استات | آلکالین فسفاتاز | ال-گلوتامیناز |
| کیتوزان | 2 | 11031* | 1778039** | 1071/8** | 928544/3** | 121363** |
| سرب | 2 | 253417/6** | 227050/2* | 735/5** | 91904/5ns | 7567/2** |
| کیتوزان × سرب | 4 | 71234/3** | 607194** | 611/3** | 311490** | 33057/9** |
| اشتباه | 18 | 120/43 | 11512/6 | 2/13 | 8224/5 | 3/06 |
| ضریب تغییرها | - | 39/1 | 38/5 | 6/7 | 28/7 | 5/6 |

ns، *و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد است.

**جدول 3-تجزیه واریانس اثر تیمارها بر فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری شده و غلظت سرب فراهم در خاک لنگرود**

| منابع تغییرها | درجه آزادی | میانگین مربع‌ها | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | غلظت سرب فراهم | اسید فسفاتاز | هیدرولیز فلورسین دی استات | آلکالین فسفاتاز | ال-گلوتامیناز |
| کیتوزان | 2 | 10085/9** | 6248/8* | 68/3ns | 6/5ns | 48/7* |
| سرب | 2 | 437203** | 4670/3* | 690/8** | 1024/8** | 2070** |
| کیتوزان × سرب | 4 | 115603/9** | 3982/7** | 262** | 305/8** | 558/2** |
| اشتباه | 18 | 43/14 | 912/9 | 7/46 | 64/01 | 1/02 |
| ضریب تغییرها | - | 26/4 | 21/2 | 7/5 | 25/5 | 12/9 |

ns، *و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد است.




**شکل 1- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر غلظت سرب فراهم در خاک. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است.**

**اثر کیتوزان و سرب بر فعالیت اسید فسفاتاز**

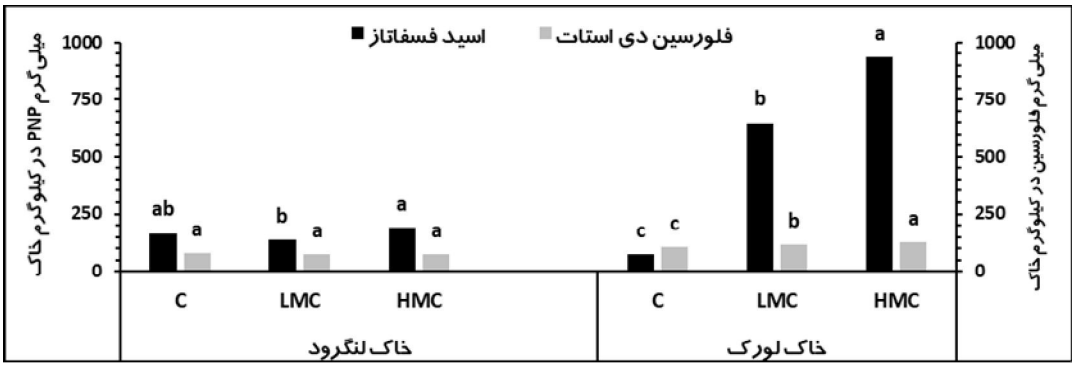
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی سرب در سطح احتمال پنج درصد، اثر اصلی کیتوزان و برهم‌کنش سرب و کیتوزان بر فعالیت اسیدفسفاتاز در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 2). در خاک لنگرود نیز اثرات اصلی کیتوزان و سرب بر فعالیت اسید فسفاتاز در سطح احتمال پنج درصد و برهم‌کنش آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3).

شکل 2 اثر نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز را در خاک‌های لورک و لنگرود نشان می‌دهد. کاربرد هر دو نوع کیتوزان در خاک لورک سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز شد (شکل 2). فعالیت اسید فسفاتاز از 75 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم در تیمار شاهد خاک لورک به 649 و 937 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم در تیمارهای کیتوزان با وزن مولکولی کم و وزن مولکولی زیاد افزایش پیدا کرد (شکل 2). با توجه به نتایج، اثر مثبت کاربرد هر دو نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در خاک لورک بیشتر از خاک اسیدی لنگرود بود.

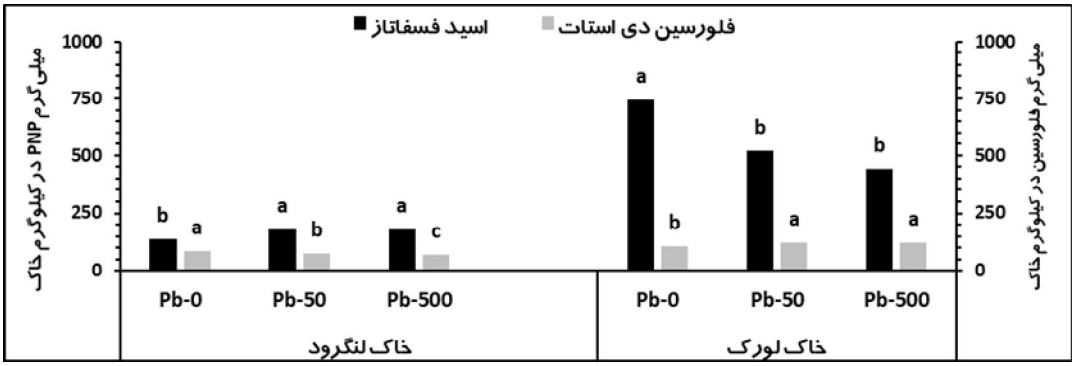
اثر اصلی سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در دو خاک لورک و لنگرود کاملاً متفاوت بود (شکل 3). در خاک لورک با افزایش غلظت سرب فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز به طور چشمگیری کاهش نشان داد حال آنکه در خاک اسیدی لنگرود کاربرد هر دو سطح سرب سبب افزایش فعالیت این آنزیم شد (شکل 3).

در شکل 4 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز نشان داده شده است. در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان اثر منفی غلظت

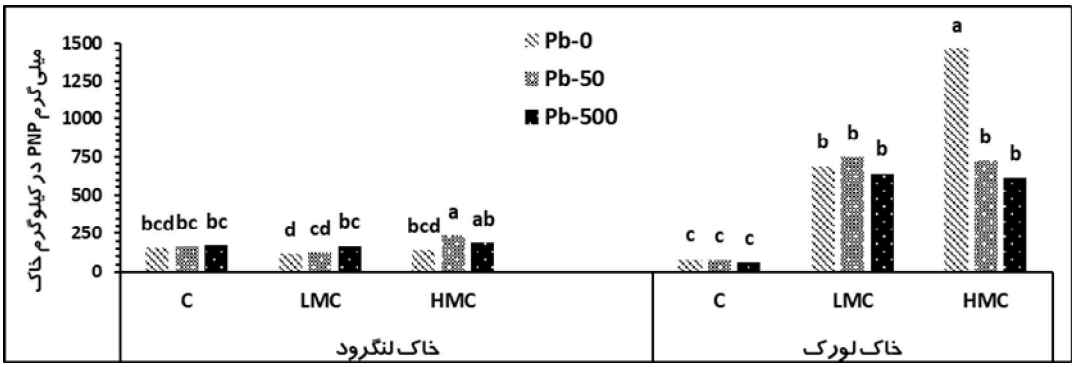
بالای سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز نسبت به تیمار شاهد را حذف کرد، ولی در خاک لنگرود تنها کاربرد کیتوزان با وزن مولکولی بالا در سطح 50 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم سبب افزایش فعالیت اسید فسفاتاز شد (شکل 4). بیشترین فعالیت آنزیم فسفاتاز در خاک لورک (1467 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم خاک) و با کاربرد همزمان کیتوزان با وزن مولکولی بالا و سطح صفر سرب (شاهد) مشاهده شد (شکل 4).




**شکل 2- اثر اصلی نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و هیدرولیز فلورسین دی استات در حضور سرب. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد**




**شکل 3- اثر اصلی سطوح سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و هیدرولیز فلورسین دی استات. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است**

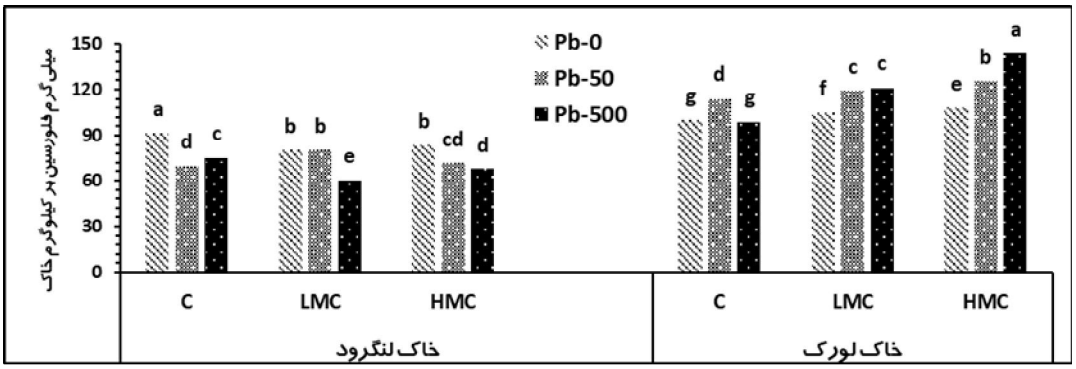



**شکل 4- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است**

**اثر کیتوزان و سرب بر هیدرولیز فلورسین دی استات**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی کیتوزان، اثر اصلی سرب و برهم‌کنش کیتوزان و سرب بر هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 2). اثر اصلی کیتوزان غیرمعنی‌دار، اثر اصلی سرب و برهم‌کنش آن‌ها بر هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لنگرود در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان موجب افزایش هیدرولیز فلورسین دی استات نسبت به تیمار شاهد شد ولی در خاک اسیدی لنگرود تاثیری بر فعالیت این هیدرولیز نداشت (شکل 2). با افزایش سطح کاربرد سرب هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لنگرود به طور چشمگیری کاهش ولی در خاک لورک افزایش پیدا کرد (شکل 3).

در شکل 5 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر هیدرولیز فلورسین دی استات نشان داده شده است. در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان به تنهایی یا همراه با سرب موجب افزایش چشمگیر هیدرولیز فلورسین دی استات نسبت به تیمار شاهد شد ولی در خاک لنگرود نتایج تقریباً برعکس بود (شکل 5). بیشترین میزان هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لورک (143/3 میلی‌گرم فلورسین بر کیلوگرم خاک) در تیمار کیتوزان با وزن مولکولی بالا و سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم مشاهد شد. در خاک لنگرود تنها تیمار دارای کیتوازن با وزن مولکولی کم و سطح 50 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم هیدرولیز فلورسین دی استات را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (شکل 5).




**شکل 5- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم هیدرولیز فلورسین دی استات. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است.**

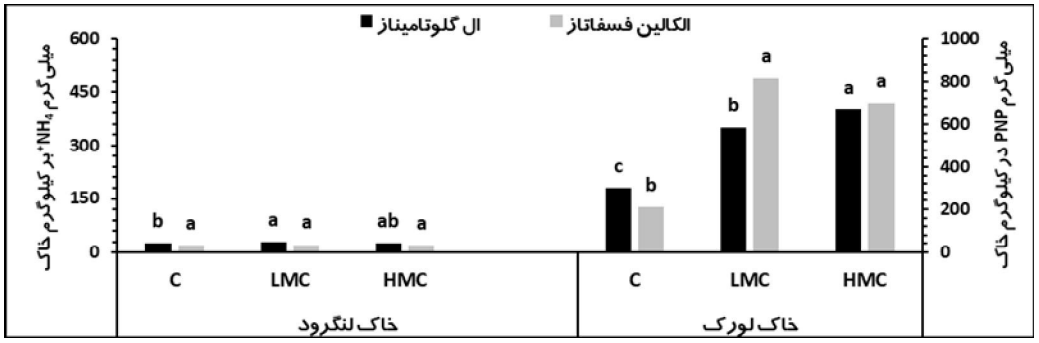
**اثر کیتوزان و سرب بر فعالیت آلکالین فسفاتاز**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی کیتوزان و برهم‌کنش کیتوزان و سرب بر فعالیت آلکالین فسفاتاز در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار و اثر اصلی سرب غیر معنی‌دار بود (جدول 2) همچنین اثر اصلی کیتوزان بر فعالیت آلکالین فسفاتاز در خاک لنگرود غیر معنی‌دار و اثر اصلی سرب و برهم‌کنش سرب و کیتوزان بر فعالیت آلکالین فسفاتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). شکل 6 اثر نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را در خاک‌های لورک و لنگرود نشان می‌دهد. کاربرد هر دو نوع کیتوزان در خاک لورک موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نسبت به شاهد شد ولی در خاک اسیدی لنگرود هیچ یک از دو نوع کیتوازن اثر چشمگیری بر فعالیت آلکالین فسفاتاز نداشت (شکل 6). فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خاک لورک به طور قابل

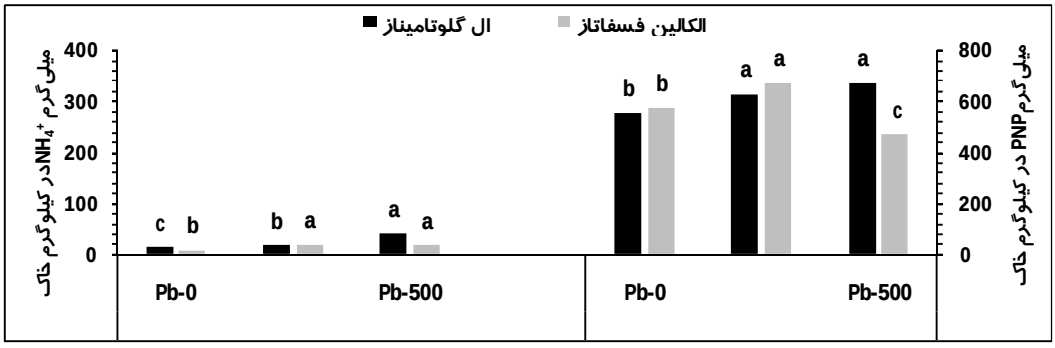
ملاحظه‌ای بیشتر از خاک لنگرود بود. در خاک لورک اثر مثبت کیتوزان با وزن مولکولی کم بر افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز بیشتر از کیتوزان با وزن مولکولی بالا بود. فعالیت آلکالین فسفاتاز از 210 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم در تیمار شاهد خاک لورک به 816 و 697 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم به ترتیب در تیمارهای کیتوزان با وزن مولکولی کم و وزن مولکولی زیاد افزایش پیدا کرد (شکل 6). با توجه به نتایج اثر مثبت کاربرد هر دو نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خاک آهکی لورک بیشتر از خاک اسیدیی لنگرود بود.

اثر اصلی سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در دو خاک لورک و لنگرود کاملا متفاوت بود (شکل 7). در خاک اسیدی لنگرود با افزایش غلظت سرب فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به طور چشمگیری افزایش نشان داد حال آنکه در خاک لورک کاربرد سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم موجب کاهش فعالیت این آنزیم شد (شکل 7).

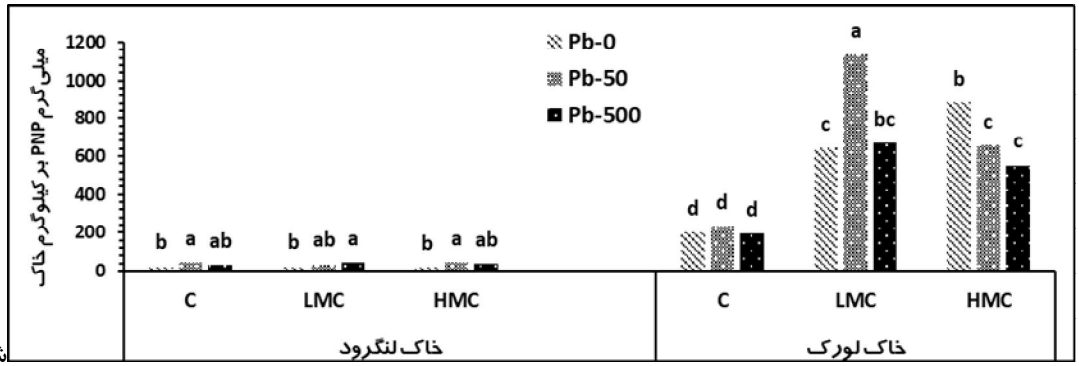
در شکل 8 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان داده شده است. در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان اثر منفی غلظت بالای سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد، در حالیکه در خاک لنگرود کاربرد هر دو نوع کیتوزان به‌تنهایی یا در حضور سطوح گوناگون سرب تاثیری بر فعالیت آلکالین فسفاتاز نداشت (شکل 8). بیشترین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خاک لورک (1136 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم خاک) و با کاربرد کیتوزان با وزن مولکولی بالا در حضور سطح 50 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم به دست آمد (شکل 8).




**شکل 6- اثر اصلی نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و ال-گلوتامیناز در حضور سرب. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد**




**شکل 7- اثر اصلی سطوح سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و ال-گلوتامیناز. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. Pb-0 ، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است**




شکل 8- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است.

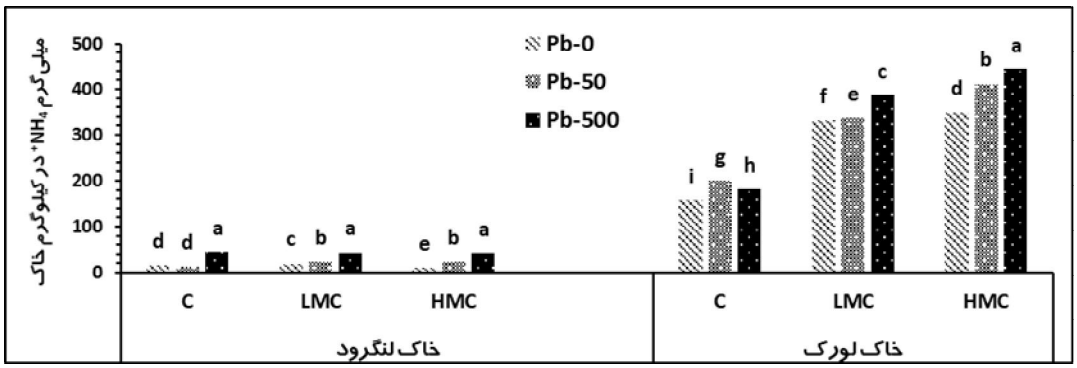
**اثر کیتوزان و سرب بر فعالیت ال-گلوتامیناز**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات اصلی کیتوزان، سرب و برهم‌کنش آن‌ها بر فعالیت ال-گلوتامیناز در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 2). در خاک لنگرود نیز اثر اصلی کیتوزان بر فعالیت ال-گلوتامیناز در سطح احتمال 5 درصد و اثر اصلی سرب و برهم‌کنش سرب و کیتوزان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). اثر نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در خاک‌های لورک و لنگرود در شکل 6 نشان داده شده است. کاربرد هر دو نوع کیتوزان در خاک آهکی لورک موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نسبت به تیمار شاهد شد ولی در خاک اسیدی لنگرود تنها کیتوازن با وزن مولکولی کم فعالیت ال-گلوتامیناز را نسبت به شاهد افزایش داد (شکل 6). فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در خاک لورک به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از خاک لنگرود بود. در خاک لورک اثر مثبت کیتوزان با وزن مولکولی زیاد بر افزایش فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز بیشتر از کیتوزان با وزن مولکولی کم بود. فعالیت ال-گلوتامیناز از 179 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم در تیمار شاهد خاک لورک به 350 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم در تیمار کیتوزان با وزن مولکولی کم و به 401 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم در تیمار کیتوزان با وزن مولکولی زیاد افزایش پیدا کرد (شکل 6). با توجه به نتایج اثر مثبت کاربرد هر دو نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خاک آهکی لورک بیشتر از خاک اسیدی لنگرود بود.

اثر اصلی سطوح سرب بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در دو خاک لورک و لنگرود مشابه بود (شکل 7). در هر دو خاک با افزایش غلظت سرب فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز به طور چشمگیری افزایش پیدا کرد. به عنوان مثال، در تیمار شاهد خاک‌های لورک و لنگرود فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز به ترتیب 278/6 و 14/7 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم بود که با کاربرد سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم فعالیت این آنزیم در خاک لورک به 335/8 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم و در خاک اسیدی لنگرود به 42/2 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم افزایش معنی‌دار پیدا کرد (شکل 7).

در شکل 9 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نشان داده شده است. در هر دو خاک کاربرد توامان کیتوزان و سرب اثر هم‌افزایی بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نشان داد. در خاک لورک کاربرد کیتوزان با وزن مولکولی بالا نسبت به کیتوزان با وزن مولکولی کم اثر بیشتری در افزایش فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نشان داد، در حالیکه در خاک لنگرود کاربرد هر دو نوع کیتوزان در حضور سرب اثر مشابهی بر فعالیت

ال-گلوتامیناز داشت (شکل 9). بیشترین فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در خاک لورک (433/5 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم خاک) و با کاربرد کیتوزان با وزن مولکولی بالا در حضور سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم مشاهده شد (شکل 9).




**شکل 9- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است.**

## بحث

نتایج نشان داد که هر دو نوع کیتوزان موجب کاهش غلظت سرب فراهم خاک‌ها نسبت به تیمار شاهد (بدون کیتوزان) شدند. بااین‌حال، رفتار این دو نوع کیتوزان مشابه نبود و کیتوزان با وزن مولکولی زیاد نسبت به کیتوزان با وزن مولکولی کم به‌طور مؤثرتری سبب کاهش غلظت سرب فراهم شد. کاهش غلظت سرب فراهم در خاک‌های مورد مطالعه ناشی از ایجاد پیوند سرب با گروه‌های عاملی کیتوزان است. کیتوزان به دلیل داشتن خاصیت چربی‌دوستی زیاد به علت وجود گروه‌های هیدروکسیل و آمینه اولیه با فعالیت زیاد و ساختار انعطاف‌پذیر زنجیره‌ی پلیمری به‌عنوان یک جاذب خوب برای تمام فلزهای سنگین شناخته شده است (بابل و کورنایوان، 2003). گروه‌های هیدروکسیلی و آمینی کیتوزان می‌توانند به عنوان مکان‌های پیوندی برای کمپلکس کردن یون‌های فلزی عمل کنند (کلودینسکا، 2011؛ تریفاتی و همکاران، 2017). در پژوهش‌های دیگر نیز نسبت به خاک‌های بهسازی نشده، استفاده از کیتوزان قابلیت دسترسی روی (Zn) در خاک و آب منفذی را کاهش داد (تریفاتی و همکاران، 2017). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که استفاده از کیتوزان در خاک مقدار نیکل قابل استخراج با DTPA را 47 درصد نسبت به شاهد کاهش داد (توران و همکاران، 2018).

فعالیت‌های آنزیمی خاک به آلودگی حساس هستند و به عنوان شاخص تخریب خاک پیشنهاد شده‌اند. با این حال در این مطالعه، رابطه واضحی بین فعالیت برخی از آنزیم‌ها و آلودگی سرب در حضور کیتوزان مشاهده نشد. فعالیت‌های آنزیمی در دو خاک به کاربرد کیتوزان و غلظت سرب به طور متفاوت پاسخ دادند.

تأثیرپذیری آنزیم اسید و آلکالین فسفاتاز در خاک به عواملی از قبیل خاک، نوع کیتوزان و سطح فلز سنگین بستگی دارد. فعالیت فسفاتازها در خاک تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک شامل میزان رس، رطوبت، عمق، دما، ماده آلی، عناصر غذایی، pH و ویژگی‌های زیستی شامل جامعه میکروبی و فعالیت‌شان است (کیزیلکایا و همکاران، 2007). بیر و همکاران (1992) نیز گزارش کردند که فعالیت‌های بیولوژیکی در خاک از جمله اندازه توده‌ی زنده میکروبی، فعالیت

آلکالین فسفاتاز و دهیدروژناز تحت تأثیر نوع خاک قرار می‌گیرد. میانگین فعالیت اسید فسفاتاز در خاک‌های آلوده به فلزها سنگین 25/95 درصد فعالیت این آنزیم در خاک‌های غیرآلوده بود (لیائو و هوانگ ، 2005). زنگ و همکاران (2007) در غلظت کم سرب اثر تحریکی آن بر فعالیت آنزیم‌های خاک را مشاهده کردند. با این حال، هنگامی که سطح سرب به 500 میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش داده شد، فعالیت آنزیم‌های خاک کاهش پیدا کرد. ویسکوفسکا و همکاران (2006) نتیجه گرفتند که سرب در غلظت 50 میلی‌گرم در کیلوگرم فعالیت آنزیم‌های خاک از جمله اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز را مهار می‌کند. خان و همکاران (2010) در بررسی اثر سرب، کادمیم و ترکیب سرب-کادمیم بر ساختار جامعه‌ی میکروبی به این نتیجه رسیدند که سرب و/یا کادمیم موجب بازدارندگی فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و کاهش کربن توده‌ی زنده میکروبی می‌شوند. این پژوهشگران همچنین بیان داشتند که شدت بازدارندگی به نوع فلز، غلظت فلز و مدت زمان انکوباسیون بستگی دارد. پان و یو (2011) گزارش کردند که سرب و کادمیم موجب بازدارندگی فعالیت اسید فسفاتاز، اوره‌آز و دهیدروژناز و همچنین تغییر ساختار جامعه‌ی میکروبی می‌شوند. آنها اظهار داشتند که آلودگی ترکیبی سرب و کادمیم اثر بازدارندگی بیشتری برای آنزیم‌های خاک نسبت به آلودگی سرب و کادمیم به تنهایی دارد. به علاوه، غلظت بالاتر این فلزها منجر به بازدارندگی بیشتر شد.

گزارش شده است که میزان بازدارندگی و فعال‌سازی فعالیت آنزیم‌های خاک به عواملی مانند یون فلز سنگین، غلظت فلز، نوع آنزیم، برهمکنش فلزهای سنگین، واکنش بین فلز سنگین و گروه‌های فعال آنزیم‌ها، مواد فیزیکی-شیمیایی و ویژگی‌های خاک (pH، ماده‌ی آلی، نوع و مقدار رس) بستگی دارد (کاراکا و همکاران ، 2010). هر آنزیم خاکی حساسیت متفاوتی به نوع فلز سنگین و شکل شیمیایی آن در محلول خاک نشان می‌دهد (کاراکا و همکاران، 2010). در همین راستا اسفیر و همکاران (1999) گزارش کردند که آرسنیک موجب بازدارندگی فعالیت فسفاتاز و سولفاتاز شد ولی بر اوره‌از بی‌تأثیر بود. واکنش‌های آنزیمی به سه روش گوناگون توسط فلزهای سنگین مهار می‌شوند: (1) کمپلکس کردن سوبسترا (2) ترکیب شدن با گروه‌های عاملی روی آنزیم که توسط پروتئین فعال می‌شوند و (3) واکنش با کمپلکس آنزیم –سوبسترا (ویگ و همکاران، 2003؛ تجادا و همکاران، 2008).

هیدرولیز فلورسین دی استات توسط پروتئینازها، لیپازها و استرازها برای تعیین مقدار قارچ‌ها و باکتری‌های فعال استفاده شده است (اشنورر و راسوال، 1982؛ گسپار و همکاران، 2001). هیدرولیز فلورسین دی استات همچنین به عنوان شاخص خوبی برای فعالیت میکروبی و آلودگی فلزها در خاک در نظر گرفته می‌شود (اشنورر و راسوال، 1982؛ لی و همکاران، 2009). جین یان و همکاران (2014) با کاربرد غلظت‌های صفر تا 2400 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم در دو خاک قرمز گزارش کردند که با افزایش غلظت سرب هیدرولیز فلورسین دی استات به طور چشمگیری در هر دو خاک نسبت به تیمار شاهد کاهش پیدا کرد. برخی پژوهش‌ها نشان داد که اثر فلز سنگین بر هیدرولیز فلورسین دی استات متغیر است و سنجش فعالیت‌های آن پروتکل مناسبی برای اندازه‌گیری آلودگی آنتیموان نیست (آن و کیم، 2009).

ال-گلوتامیناز به مقادیر اندک یون‌های فلزی شدیدا حساس است. سوبسترای این آنزیم یعنی ال گلوتامین به شکلی از نیتروژن که برای گیاهان قابل دسترس است هیدرولیز می‌شود. مطالعات فرانکنبرگر و طباطبایی (1991) و هارتمن (1971) نشان دادند که فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز توسط یون‌های فلزی سرب، جیوه، نقره و مس مهار می‌شود. اکنلر و طباطبایی (2004) اثر آهک‌دهی و کشاورزی طولانی‌مدت بر فعالیت آریل آمیداز و آمیدوهیدرولازها (آمیداز، اوره‌آز، ال آسپاراژیناز و ال-گلوتامیناز) را مورد بررسی قراردادند. فعالیت آنزیم-ها به طور چشمگیری با pH خاک همبستگی مثبت نشان

داد. در بین آنزیم‌های مورد بررسی ال-گلوتامیناز بیشترین حساسیت را به pH نشان داد. بنابراین pH اسیدی خاک لنگرود یکی از دلایل فعالیت بسیار کمتر آنزیم ال-گلوتامیناز در این خاک نسبت به خاک لورک است. ال-گلوتامیناز منشا میکروبی دارد در نتیجه هرگونه تغییری که منجر به افزایش یا کاهش فعالیت‌های میکروبی گردد فعالیت این آنزیم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (فرانکنبرگر و طباطبایی، 1991).

جیانفردا و بولاگ (1996) گزارش کردند که در حضور مهارکننده‌ها، سطح فعالیت نهایی مجموعه‌های آنزیمی به یک سری از ویژگی‌های کاتالیزوری آنزیم مانند: تشکیل پروتئین، هندسه محل فعال، دسترسی به سوبسترا و غیره وابسته است. نتایج این مطالعه تفاوت‌های زیادی بین فعالیت‌های آنزیمی بین دو خاک آزمایش شده نشان داد. این اختلافات احتمالاً تحت تأثیر برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌ها، به عنوان مثال، pH، میزان کربن آلی و رس قرار گرفته است (اسپیر و همکاران ، 1992). مطالعات متعددی به بررسی روابط بین فعالیت آنزیم و pH خاک اختصاص یافته است. همبستگی مثبت و منفی و عدم همبستگی مشاهده شده است (زانتوا و همکاران ، 1977؛ ابرامیان و گالستیان ، 1981؛ کامرفورد و فاکس، 1992). همبستگی قوی بین pH خاک و حداکثر فعالیت فسفاتازها نشان می‌دهد که پایداری و میزان تولید و آزادسازی این آنزیم‌ها توسط جامعه میکروبی خاک احتمالاً با pH خاک مرتبط است. در همین راستا رنلا و همکاران (2003) گزارش دادند که آلکالین فسفاتاز در خاک اسیدی، در حالیکه اسید فسفاتاز در خاک قلیایی حساس‌تر است. در خاک لورک فعالیت‌های آنزیمی به طور چشمگیری بیشتر از خاک اسیدی لنگرود بود. دلیل آن می‌تواند شرایط مساعدتر خاک لورک از نظر pH و مقدار رس برای فعالیت جامعه میکروبی نسبت به خاک لنگرود باشد. در همین راستا، زنگ و همکاران (2007) در یک آزمایش گلدانی، اثر تیمار سرب بر فعالیت آنزیمی خاک را در یک سیستم خاک-سرب -برنج مورد بررسی قرار دادند. مهار زیاد فعالیت آنزیمی در خاک شنی با میزان ماده آلی کم مشاهده شد. به همین ترتیب، رنلا و همکاران (2003) دریافتند که مهار آنزیم در خاک شنی بیشتر از خاک‌های ریز بافت است زیرا رس از فعالیت آنزیم خاک محافظت می‌کند.

میکروارگانیسم‌های خاک و فرآیندهای میکروبی خاک نسبت به تغییرات کمی و کیفی ماده آلی خاک بسیار حساس هستند (کندلر و همکاران ، 1999). تفاوت در فعالیت آنزیم‌های خاک به تغییرات مرتبط با مدیریت در خصوصیات شیمیایی خاک، مانند میزان ماده آلی خاک نسبت داده شده است (تریزر-سپیدا و همکاران، 2008). تجادا و همکاران (2008) دریافتند که افزایش سطح نیکل باعث کاهش فعالیت‌های آنزیمی خاک شد و بهسازی خاک با ضایعات آلی (کمپوست، کود مرغی) سمیت نیکل برای فعالیت‌های آنزیمی خاک را کاهش داد. بهسازهای آلی فعالیت آنزیمی خاک را به دلایل زیر تقویت می‌کنند: (1) آنزیم‌های درون و برون سلولی باعث تحریک فعالیت میکروبی در مواد اضافه شده می‌شوند، (2) گروه‌های عاملی کربوکسیل، فنول، الکل و کربونیل موجود در مواد آلی با یون‌های سمی واکنش نشان می‌دهند و با تشکیل کمپلکس (کلات کردن فلز) موجب تثبیت آنها می‌شوند (پاسکول و همکاران، 1998). کورو (1996) با کاربرد کیتوزان و باسیلوس سابتیلیس در خاک آلوده به فلزهای سنگین (سرب، مس و روی) افزایش در فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز و کیتوزاناز را گزارش کرد. این پژوهشگر بیان داشت پلی ساکارید کیتوزان رشد باسیلوس‌ها در خاک را تحریک می‌کند. کیتوزان دارای خواص بسیار خوبی به عنوان سکونتگاه برای اطمینان از ادامه رشد باکتری‌ها، سیمان‌سازی سلول‌های میکروبی و فعل و انفعالات متابولیکی در بسترهای جامد مانند خاک است (کورو، 1996). در مطالعه کورو (1996) جمعیت باکتریایی بالاتر با تولید آنزیم بیشتر (فسفاتاز و کیتوزاناز) در تیمار ترکیبی کیتوزان-باسیلوس نسبت به تیمارهای تکی یا شاهد (خاک به علاوه فلز سنگین) همبستگی داشت. این

همبستگی، فعالیت بیولوژیکی بالاتر که توسط پلیمر کیتوزان در تیمارهای مخلوط تحریک شده بود را تأیید می‌کند. در مطالعه حاضر نیز، اکثر فعالیت‌های آنزیمی مورد بررسی در تیمارهای دارای کیتوزان که ماده آلی بیشتری داشتند نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود. کیتوزان می‌تواند برای رشد میکروبی خاک برخی مواد مغذی را فراهم کند و با سرب کلات تشکیل دهد سپس بر روی سرب قابل دسترس در خاک تاثیر بگذارد.

## نتیجه‌گیری

کاربرد کیتوزان در دو خاک آهکی و اسیدی آلوده به سرب قابلیت دسترسی این فلز را کاهش داد. برهمکنش سرب و کیتوازن بر فعالیت‌های آنزیمی بین آنزیم‌ها و بین دو خاک متفاوت و به نوع آنزیم، نوع خاک، نوع کیتوزان و غلظت سرب وابسته بود. اثر مثبت کاربرد هر دو نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌ها در خاک آهکی لورک به دلیل شرایط مساعدتر آن برای فعالیت جامعه میکروبی بیشتر از خاک اسیدی لنگرود بود. کیتوزان با وزن مولکولی بالا در کاهش فراهمی سرب و افزایش فعالیت آنزیم‌ها موثرتر از کیتوزان با وزن مولکولی کم بود. اثر بازدارندگی جزئی یا فعال‌کنندگی کیتوزان بر فعالیت‌های آنزیمی به نوع کیتوزان، خاک و آنزیم بستگی داشت. سرب می‌تواند موجب افزایش یا کاهش فعالیت-های آنزیمی خاک شود که اثر آن به غلظت سرب، خاک و آنزیم بستگی دارد. به‌طور کلی حضور هم‌زمان کیتوزان و فلز سنگین می‌تواند موجب افزایش یا کاهش فعالیت‌های آنزیمی شود که اثر آن به خاک، آنزیم، غلظت فلزسنگین و نوع کیتوزان وابسته است. اندازه‌گیری آنزیم‌های خاک به عنوان شاخص‌های زیستی خاک در مناطق آلوده به فلزهای سنگین می‌تواند اثرات مواد بهساز افزوده شده به خاک را به خوبی نشان دهد.

## سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شده است که نویسندگان بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## فهرست منابع:

1. Abramyan, S. and Galstyan, A. 1981. Acidic basic regulation of soil enzyme action. Pochvovedenie 5: 39-45.
2. An, Y.-J. and Kim, M. 2009. Effect of antimony on the microbial growth and the activities of soil enzymes. Chemosphere 74: 654-659.
3. Babel, S. and Kurniawan, T.A. 2003. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: A review. Journal of Hazardous Materials 97: 219-243.
4. Beyer, L., Wachendorf, C., Balzer, F. and Balzer-Graf, U. 1992. The effect of soil texture and soil management on microbial biomass and soil enzyme activities in arable soils of northwest germany. Agribiological Research (Germany) 276-283.
5. Burt, R. 2004. Soil survey laboratory methods manual.
6. Ciarkowska, K. 2015. Heavy metal contamination of soils. Springer.
7. Cuero ,R. 1996. Enhanced heavy metal immobilization by a bacterial-chitosan complex in soil. Biotechnology Letters 18: 511-514.
8. Ekenler, M. and Tabatabai, M. 2004. Arylamidase and amidohydrolases in soils as affected by liming and tillage systems. Soil and Tillage Research 77: 157-168.
9. Fox, T. and Comerford, N. 1992. Rhizosphere phosphatase activity and phosphatase hydrolyzable organic phosphorus in two forested spodosols. Soil Biology and Biochemistry 24: 579-583.
10. Frankenberger Jr, W. and Tabatabai, M. 1991. Factors affecting L-glutaminase activity in soils. Soil Biology and Biochemistry 23: 875-879.
11. Gaspar, M.L., Cabello, M.N., Pollero, R. and Aon, M.A. 2001. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil. Current Microbiology 42: 339-344.

12. Gianfreda, L. and Bollag, J. 1996. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. Soil biochemistry 9: 123-194.
13. Green, V.S., Stott, D.E. and Diack, M. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. Soil Biology and Biochemistry 38: 693-701.
14. Hartman, S.C. 1971. The enzymes. Elsevier.
15. Jin-Yan, Y., Zhen-Li, H., YANG, X.-E. and Ting-Qiang, L. 2014. Effect of lead on soil enzyme activities in two red soils. Pedosphere 24: 817-826.
16. Kamari, A., Pulford, I. and Hargreaves, J. 2011. Binding of heavy metal contaminants onto chitosans–an evaluation for remediation of metal contaminated soil and water. Journal of Environmental Management 92: 2675-2682.
17. Kandeler, E., Tscherko, D. and Spiegel ,H. 1999. Long-term monitoring of microbial biomass, n mineralisation and enzyme activities of a chernozem under different tillage management. Biology and Fertility of Soils 28: 343-351.
18. Karaca, A., Cetin, S.C., Turgay, O.C. and Kizilkaya, R. 2010. Soil heavy metals. Springer.
19. Khan, S., Hesham, A.E.-L., Qiao, M., Rehman, S. and He, J.-Z. 2010. Effects of cd and pb on soil microbial community structure and activities. Environmental Science and Pollution Research 17: 288-296.
20. Kizilkaya, R., Bayrakli, F. and Surucu, A. 2007. Relationship between phosphatase activity and phosphorus fractions in agricultural soils. Int J Soil Sci 2: 107-118.
21. Kołodyńska, D. 2011. Chitosan as an effective low-cost sorbent of heavy metal complexes with the polyaspartic acid. Chemical Engineering Journal 173: 520-529.
22. Li, Y.-T., Rouland, C., Benedetti, M., Li, F.-b., Pando, A., Lavelle, P. and Dai, J. 2009. Microbial biomass, enzyme and mineralization activity in relation to soil organic c, n and p turnover influenced by acid metal stress. Soil Biology and Biochemistry 41: 969-977.
23. Liao, M. and Huang, C.-y. 2005. Effect of combined pollution by heavy metals on soil enzymatic activities in areas polluted by tailings from pb-zn-ag mine. Journal of Environmental Sciences 17: 637-640.
24. Liu, L., Li, W., Song, W. and Guo, M. 2018. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. Science of the Total Environment 633: 206-219.
25. Ngo, D.-H., Vo, T.-S., Ngo, D.-N., Kang, K.-H., Je, J.-Y., Pham, H.N.-D ,.Byun, H.-G. and Kim, S.-K. 2015. Biological effects of chitosan and its derivatives. Food Hydrocolloids 51: 200-216.
26. Pan, J. and Yu, L. 2011. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. Ecological Engineering 37: 1.١٨٩٤-٨٨٩
27. Pascual, J.A., Hernandez, T., Garcia, C. and Ayuso, M. 1998. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: Laboratory experiment. Bioresource Technology 64: 131-138.
28. Prosser, J.A., Speir, T.W. and Stott, D.E. 2011. Soil oxidoreductases and fda hydrolysis. Methods of soil enzymology 9: 103-124.
29. Renella, G., Ortigoza, A.R., Landi, L. and Nannipieri, P. 2003. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and atp content of soil as estimated by the ecological dose (ed50). Soil Biology and Biochemistry 35: 1203-1210.
30. Schnürer, J. and Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Applied and Environment Microbiology 43: 1256-1261.
31. Soga, B.H. 2001. Regeneration of heavy metal contaminated soil leachate with chitosan flakes. Doctoral dissertation, McGill University Libraries.

32. Sparks, D.L., Page, A., Helmke, P., Loeppert, R., Soltanpour, P., Tabatabai, M., Johnston, C. and Sumner, M. 1996. Methods of soil analysis. Part 3-chemical methods. Soil Science Society of America Inc.
33. Speir, T., August, J. and Feltham, C. 1992. Assessment of the feasibility of using cca (copper, chromium and arsenic)-treated and boric acid-treated sawdust as soil amendments. Plant and Soil 142: 235-248.
34. Speir, T., Kettles, H., Parshotam, A., Searle, P. and Vlaar, L. 1999. Simple kinetic approach to determine the toxicity of as [v] to soil biological properties. Soil Biology and Biochemistry 31: 705-713.
35. Tabatabai, M. 1994. Soil enzymes. Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties 5: 775-833.
36. Tejada, M., Moreno, J., Hernández, M. and García, C. 2008. Soil amendments with organic wastes reduce the toxicity of nickel to soil enzyme activities. European Journal of Soil Biology 44: 129-140.
37. Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. and Gil-Sotres, F. 2008. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. Soil Biology and Biochemistry 40: 2146-2155.
38. Tripathi, N., Choppala, G. and Singh, R.S. 2017. Evaluation of modified chitosan for remediation of zinc contaminated soils. Journal of Geochemical Exploration 182: 180-184.
39. Turan, V., Ramzani, P.M.A., Ali, Q., Abbas ,F., Iqbal, M., Irum, A. and Khan, W.-u.-D. 2018. Alleviation of nickel toxicity and an improvement in zinc bioavailability in sunflower seed with chitosan and biochar application in ph adjusted nickel contaminated soil. Archives of Agronomy and Soil Science 64: 1053-1067.
40. Vig, K., Megharaj, M., Sethunathan, N. and Naidu, R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: A review. Advances in Environmental Research 8: 121-135.
41. Wuana, R.A. and Okieimen, F.E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. Isrn Ecology 2011.
42. Wyszkowska, J., Kucharski, J. and Lajszner, W. 2006. The effects of copper on soil biochemical properties and its interaction with other heavy metals. Polish Journal of Environmental Studies 15.
43. Zantua, M., Dumenil, L. and Bremner, J. 1977. Relationships between soil urease activity and other soil properties 1. Soil Science Society of America Journal 41: 350-352.
44. 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. Ecotoxicology and Environmental Safety 67: 67.٧٤-
45. Zhang, L., Zeng, Y. and Cheng, Z. 2016. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review. Journal of Molecular Liquids 214: 175-191.

# Investigating chitosan interaction with lead on enzyme activities in two acidic and calcareous soils

**S. Afrough[1], and F. Nourbakhsh**
Ph.D. student, Dep. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology;
E-mail: saeede.afrough@gmail.com
Professor, Dep. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology;
E-mail:farshid@cc.iut.ac.ir
Received: August, 2020 & Accepted: june, 2021

**Abstract**

Chitosan is a natural and destructive polymer that consists of glucosamine units, which, due to reactive groups, can reduce the availability of heavy metals and change soil enzyme activities which is an indicator of soil quality. However, little information is available on simultaneous effect of chitosan and heavy metals on soil enzymes activities. In this study, the interaction of chitosan at three levels of control, low molecular weight (LMC), and high molecular weight (HMC) with Pb at three levels of 0, 50 and 500 mg/kg on available soil lead (Pb) investigated on activity of acid and alkaline phosphatase, L-glutaminase and fluorcine diacetate hydrolysis enzymes in two different soils, Lavark and Langroud. The results were statistically compared. Both chitosan types significantly reduced available Pb concentration in two soils, but HMC was more effective. In Lavark soil, LMC and HMC application to Pb treatments significantly increased the activity of acid and alkaline phosphatase, L-glutaminease and fluorcine diacetate hydrolysis compared to control treatments. In Langroud soil, LMC application to Pb treatments significantly increased L-glutaminease activity, but did not affect the activity of other enzymes. The HMC application in Langroud soil also did not significantly affect activity of any enzymes compared to control. Level of 50 mg/kg Pb in the presence of chitosan significantly decreased acid phosphatase activity in Lavark soil and hydrolysis of fluorcine diacetate hydrolysis in Langroud soil compared to control, but had a positive effect on the activity of other enzymes. Level of 500 mg/kg Pb in the presence of chitosan also reduced acid and alkaline phosphatase activity in Lavark soil and hydrolysis of fluorcine diacetate in Langroud soil, but significantly increased the activity of other enzymes. Generally, increasing or decreasing enzyme activity due to the simultaneous presence of chitosan and Pb depended on soil, enzyme, Pb concentration, and chitosan type.

**Keywords**: Chitosan, calcareous or acidic soil, enzyme activity, heavy metal

[1]. Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agricultural, Isfahan University of Technology.