شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: آلودگی زیست‌بوم، سلامت انسان و زیست‌پالایی

اثر نانو ذرات اکسید روی، مس و آهن بر زنده مانی کرم خاکی ایزنیا فتیدا *(Eisenia fetida)*

مهدی زارعی[۱]، زهرا احمدآبادی[۲۱]و لیلا صادق کسمایی[۲]

[۱] دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

[۲] دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

چکیده

این مطالعه در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار با هدف بررسی اثرات سه نانو ذره بر برخی خصوصیات کرم خاکی ایزنیا فتیدا صورت گرفت. تیمارها شامل سطوح مختلف نانو ذرات اکسید روی، مس و آهن بودند که در قالب ۹ تیمار بررسی شدند. بعد از آماده سازی بستر، کرم های بالغ به گلدان‌های ۲ کیلویی حاوی بسترهای مذکور اضافه شدند. پس از یک هفته محلول نانو ذرات شامل سطوح مختلف ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم نانو ذرات در هر کیلو گرم بستر که در آب لازم برای مرطوب نگه داشتن بستر حل شد، به بسترها اضافه شد. بسترها به مدت ۷۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با رطوبت بستر ۷۰ درصد نگهداری شدند. در پایان دوره، اثر نانو ذرات بر وزن کرم، مرگ و میر، تعداد کوکون و وزن کوکون بررسی شد. نتایج نشان داد که تعداد کرم، وزن کرم و تعداد کوکون در بستر با افزایش نانو ذرات نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. نتایج این مطالعه همچنین حاکی از اثرات سمی نانو ذرات بر کرم خاکی بوده و می‌تواند هشداری برای کاربرد و رهاسازی رو به افزایش این ذرات در محیط زیست و اکوسیستم موجودات خاکزی از جمله کرم خاکی باشد.

کلمات کلیدی: موجودات خاکزی، محیط زیست، وزن کرم

مقدمه

تولید و استفاده از نانوذرات به سرعت در حال افزایش است؛ بنابراین نانو ذرات ممکن است خواسته یا ناخواسته در محیط رها و باعث اثرات نامطلوب بر محیط زیست شوند. این ذرات ممکن است سبب تولید گونه‌های رادیکال آزاد اکسیژن شود (ROS, Reactive oxygen species) که می‌تواند ساختارهای سلولی را تخریب کنند و در متابولیسم نرمال سلول اختلال ایجاد کند (Hu و همکاران ۲۰۱۰؛ Nel و همکاران ۲۰۰۶و Gogoi و همکاران۲۰۰۶). مطالعات بیشتری برای بررسی اثرات سمیت نانوذرات بر بشر و محیط زیست مورد نیاز است (Roco ۲۰۰۵). در این زمینه، نانو ذرات اکسید مس (CuO)، اکسید روی (ZnO) و اکسید آهن (FeO) با توجه به کاربردهای گسترده شان بیشتر قابل توجه هستند. با توجه به آنچه گفته شد و با در نظر گرفتن کاربردهای متعدد فناوری نانو در کشاورزی، صنایع غذایی و علوم دامی، احتمال حضور ذرات نانو در محیط زیست و در بستر رشد و نمو موجودات خاکی رو به افزایش است. یکی از مهمترین موجودات خاکزی کرم خاکی می‌باشد. کرم‌های خاکی به عنوان شاخص‌های بیولوژیک آلودگی زیست محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرند. تحقیقات زیادی نیز بر روی این جانور خاکزی انجام شده است. گونه ایزنیا فتیدا به تغییرات زیست محیطی مقاوم بوده و دارای نرخ تولید مثل و تغذیه بالاست (Smith ۱۹۹۸؛ Ramirez و همکاران ۱۹۹۹). تحقیقات انجام شده در مورد اثرات پرکلرات بر *ایزنیا فتیدا* نشان داد که زنده‌مانی کرم و تولید کوکون (تخم) با افزایش غلظت پرکلرات کاهش می‌یابد. بقا و خروج نوزاد کرم از تخم‌ها در کرم‌های که در معرض پرکلرات بودند نسبت به کرم‌هایی که در معرض پرکلرات نبودند کمتر بود (Landrum و همکاران ۲۰۰۶). هو و همکاران اثرات سمیت نانو ذرات اکسید روی (ZnO) و اکسید تیتانیوم (TiO_2)را بر *ایزنیا فتیدا* مطالعه کردند و نشان دادند که سمیت و تجمع عناصر، زمانی که غلظت نانوذرات بالا می‌رود افزایش می‌یابد (Hu و همکاران، ۲۰۱۰). برسی اثرات نانو اکسید آلومینیوم (Al_2O_3) بر *ایزنیا فتیدا* نشان داد که اندازه و غلظت Al_2O_3 می‌تواند بر تجمع و تولید مثل کرم‌ها موثر باشد (Coleman و همکاران ۲۰۱۰). از آنجا که مطالعات کمی در زمینه اثرات ورود نانو ذرات به محیط زیست و اکوسیستم موجودات خاکزی از جمله کرم خاکی در کشور صورت گرفته است، لذا هدف این مطالعه بررسی اثرات نانوذرات مس، روی و آهن بر زنده‌مانی کرم‌خاکی ایزنیا فتیدا در بستر کود گاوی می‌باشد.

*ا ایمیل نویسنده مسئول: Zahra.ahmadabadi@yahoo.com

مواد و روش‌ها

این مطالعه در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سطوح مختلف ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم نانو ذره در کیلوگرم از بستر کود از نانو ذرات اکسید مس (CuO)، اکسید روی (ZnO) و اکسید آهن (FeO) به شرح T_1 (Fe_0 Zn_0 Cu_0) (شاهد)، T_2 ($Fe_{0.25}$)، T_3 ($Zn_{0.25}$)، T_4 ($Cu_{0.25}$)، T_5 ($Fe_{0.5}$)، T_6 ($Zn_{0.5}$)، T_7 ($Cu_{0.5}$)، T_8 ($Fe_{0.25}$ $Zn_{0.25}$ $Cu_{0.25}$) و T_9 ($Fe_{0.5}$ $Zn_{0.5}$ $Cu_{0.5}$) بود. از کود گاوی تهیه شده در مرکز دامپروری دانشگاه شیراز به عنوان بستر پرورش کرم استفاده شد. کرم‌های خاکی *ایزنیا فتیدا* نیز از مزرعه تولید ورمی‌کمپوست بخش علوم خاک دانشکده کشاورزی تهیه شد. نانو ذرات مورد استفاده از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه شدند. جدول ۱ خصوصیات این نانو ذرات را نشان می‌دهد که بر اساس اطلاعات ارائه شده توسط کارخانه سازنده می‌باشد. در مجموع ۲۷ گلدان حاوی ۲ کیلو گرم از بسترها آماده شد. سوراخ‌های کوچکی در ته گلدان‌ها برای خروج آب اضافی ایجاد شد. همچنین روی گلدان‌ها برای جلوگیری از خروج کرم ها پارچه قرار داده شد. سپس، ۱۰ کرم بالغ با وزن تقریبی ۵۰۰ تا ۸۰۰ میلی گرم که حلقه کلیتلوم آنها تشکیل شده بود به هر گلدان اضافه شد. کرم‌ها جهت تطبیق با شرایط جدید به مدت یک هفته در دمای ۳۰ -۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بستر ۷۰ درصد نگهداری شدند. در این دوره، رطوبت بسترها از طریق اسپری آب بر آنها کنترل می‌شد. پس از یک هفته نانو ذرات در قالب تیمارهای ذکر شده در ۴۰ میلی لیتر آب حل شد و به هر یک از بسترها اضافه شد. کرم‌ها در این شرایط به مدت ۷۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت بستر ۷۰ درصد نگهداری شدند. پس از طی شدن دوره ۷۵ روزه تعداد کرم‌ها شمارش شد. کرم‌های خاکی از بسترها جدا شده و در سبد سوراخ‌دار قرار گرفتند. کرم‌ها جهت حذف بستر از روی بدنشان با آب شسته شدند و سپس وزن کرم‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. پس از دو بار غربالگری بسترها با استفاده از الک ۶ میلی‌متری، بسترها مجددا به وسیله یک الک ۳ میلیمتری غربالگری شد و تعداد کوکون‌ها شمارش شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 19 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار اکسل (Excel 2010) استفاده شد.

جدول ۱- برخی خصوصیات نانو ذرات مورد استفاده طبق شرکت سازنده

خصوصیات	CuO	ZnO	FeO
درصد خلوص ٪	۹۹	۹۹	۹۸
میانگین اندازه ذرات (nm)	۴۰	۲۰	۲۵
سطح ویژه (m^2/g)	۲۰	۴۰	۵۰

نتایج و بحث

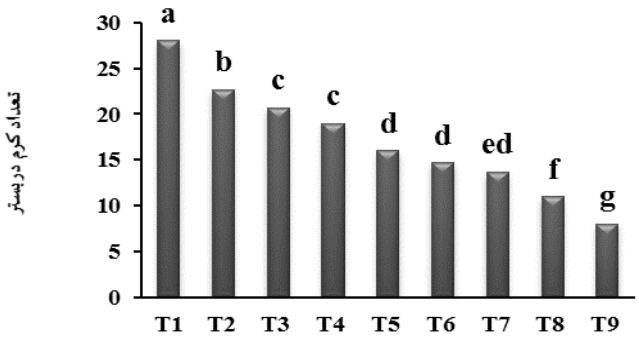
نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمارهای نانو ذرات، بر تعداد کرم موجود در ورمی‌کمپوست در پایان دوره در سطح احتمال ۱ درصد آماری معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱) نشان داد که بیشترین تعداد کرم در پایان آزمایش در تیمار T_1 (Fe_0 Zn_0 Cu_0) و بدون اضافه کردن نانو ذرات مشاهده شد. کمترین تعداد کرم مربوط به تیمار T_9 ($Fe_{0.5}$ $Zn_{0.5}$ $Cu_{0.5}$) بود . نتایج نشان می‌دهد که با افزایش سطح نانو ذرات تعداد کرم در بستر کاهش می‌یابد. این کاهش تعداد کرم به ترتیب از تیمار T2 تا T9 ۳۳/۵۷، ۳۷/۱۴، ۴۰/۷۱، ۴۰/۶۹، ۴۸/۹۲، ۵۳/۵۷، ۵۶/۰۷ و ۶۰/۷۱ درصد نسبت به شاهد (T_1) بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس وزن کرم‌های موجود در بستر نشان داد که اثر تیمار-های نانوذرات بر وزن کرم در سطح احتمال ۵ درصد آماری معنی‌دار بود (جدول۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین وزن کرم‌ها (شکل ۲) بیشترین وزن کرم در تیمار T_1 (Fe_0 Zn_0 Cu_0) (شاهد) و بدون اضافه کردن نانوذرات مشاهده شد. کمترین وزن کرم مربوط به T_9 ($Fe_{0.5}$ $Zn_{0.5}$ $Cu_{0.5}$) بود. . در واقع با افزایش سطح نانوذرات وزن کرم به ترتیب ۱۸/۱۸، ۲۱/۸۲، ۲۷/۲۷، ۲۷/۲۰، ۲۸/۱۹، ۳۵/۴۵، ۴۰/۹۱ و ۴۶/۳۶ درصد از تیمار T_2 تا T_9 نسبت به تیمار شاهد (T_1) کاهش یافت. تجزیه واریانس تعداد کوکون موجود در بستر نشان داد که اثر این تیمارها بر تعداد کوکون در سطح احتمال ۱ درصد آماری معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش سطح نانوذرات تعداد کوکون در بستر کاهش یافت. بیشترین تعداد کوکون در تیمار T_1 (Fe_0 Zn_0 Cu_0) و کمترین تعداد کوکون در تیمار T_9 ($Fe_{0.5}$ $Zn_{0.5}$ $Cu_{0.5}$) مشاهده شد (شکل ۲). این کاهش در تعداد کوکون از تیمار T_2 تا T_9 به ترتیب ۲/۳۹، ۴/۹۲، ۸/۴۲، ۱۸/۲۹، ۲۲/۸۸، ۳۳/۷۳، ۳۶/۱۵ و ۳۴/۹۲ درصد نسبت به تیمار شاهد بود. براساس نتایج بدست آمده (جدول ۲) اثر تیمارهای نانوذرات بر وزن کوکون در سطح احتمال ۱ درصد آماری معنی‌دار بود. بررسی میانگین وزن کوکون (شکل ۴) نشان داد که با

افزایش سطح نانوذرات وزن کوکون‌های تولید شده توسط کرم‌ها در بستر کاهش یافت و کمترین وزن کوکون در تیمار T_9 ($Fe_{0.5}$ $Zn_{0.5}$ $Cu_{0.5}$) مشاهده شد. این کاهش در وزن کوکون به ترتیب از تیمار T_2 تا T_9 ۹/۹۳، ۱۵/۲۴، ۱۸/۴۸، ۲۵/۴۰، ۳۰/۰۲، ۳۰/۱، ۳۷/۶۴ و ۴۴/۵۷ درصد نسبت به شاهد (T_1) بود. نتایج بدست آمده در شکل‌های ۱، ۳، و ۴ نشان می‌دهد که نانوذرات بر روی سیستم تولید مثل کرم خاکی مورد مطالعه موثر بوده و باعث کاهش تولید مثل می‌شوند.

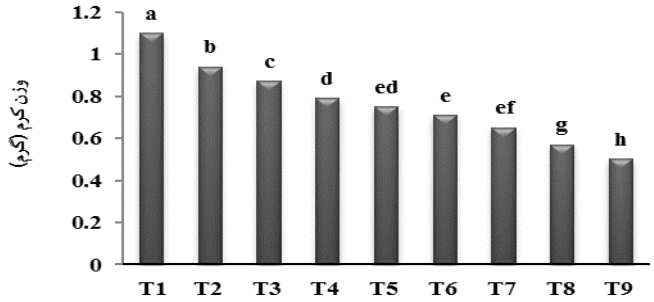
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفات مورد مطالعه در ورمیکمپوست

منبع تغییرات	درجه آزادی	تعداد کرم	وزن کرم	تعداد کوکون	وزن کوکون
تکرار	۲	۲۶/ ۷۰ **	۰/ ۰۰۷ **	۲۳/ ۳۷ **	۲/ ۰۹ **
تیمار	۹	۱۱۴/۴۰ **	۰/۱۰۵ *	۱۲۳/۱۴۸ **	۱/۷۶ **
خطا	۱۶	۱/۳۳	۰/۰۰۱	۱/۷۵	۰/۰۲۷
ضریب تغییرات		۰/۳۶	۰/۲۴	۰/۳۷	۰/۲۷

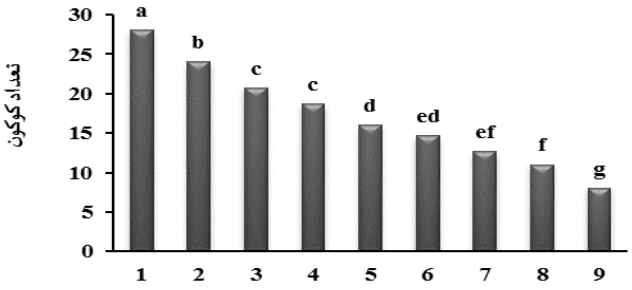
* و ** به ترتیب در سطح احتمال ۵ درصد، و یک درصد معنی‌دار است. ns غیر معنی‌دار



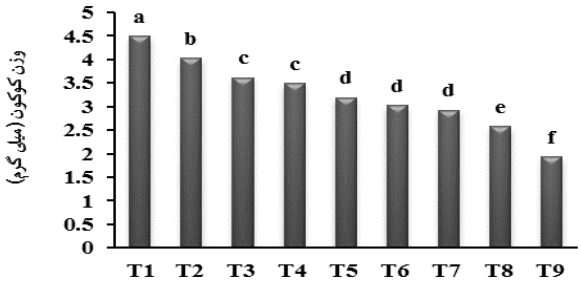
شکل۱- مقایسه میانگین تعداد کرم در بستر در پایان دوره



شکل۲- مقایسه میانگین وزن کرم در بستر در پایان دوره



شکل۳- مقایسه میانگین تعداد کوکون در بستر در پایان دوره



شکل۴- مقایسه میانگین وزن کوکون در بستر در پایان دوره

مشابه با نتایج این آزمایش اثرات سمی نانوذرات بر زنده مانی کرمهای خاکی توسط محقیق مختلف نیز گزارش شد (Lebedev و همکاران ۲۰۱۵؛ Lapied و همکاران ۲۰۱۰) نیز گزارش شد. اثر منفی نانو ذرات اکسید روی بر زنده مانی کرمها را می توان به این صورت توجیه کرد که این ذرات در مکانیسم‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن ROS (Reactive oxygen species) که منجر به تخریب دیواره سلولی می‌شود شرکت کرده و از این طریق منجر به مرگ کرمها می‌شوند (Zhang و همکاران ۲۰۰۷). به عبارت دیگر دلیل اصلی سمی بودن نانو ذرات به نقشی که در ایجاد تنش‌های اکسیداتیو دارند برمی‌گردد، که منجر به تخریب لیپیدها، کربوهیدراتها، پروتئین ها و DNA می‌شود (Kelly و همکاران ۱۹۹۸). در واقع نانو ذرات فلزی از جمله نانو ذرات روی و مس به دلیل میزان جذب بالا توسط ارگانیسمهای خاکزی، باعث شکل گیری فعالیتهای سمی و تحریک کننده در جانوران خاکزی شده که منجر به تخیله محتوای آنزیمهای دستگاه گوارش در این جانداران میشود (Zaltauskaite و Sodiene ، ۲۰۱۰). نانو ذرات از طریق جایگزینی محتویات دستگاه گوارش با نانوذرات موجود در بستر با راه اندازی واکنشهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی منجر به نیاز اضافی برای انرژی میشود که این عدم تامین نیاز انرژی باعث کاهش در رشد کرمها و کاهش در تولید آنزیمهای دفاعی در شرایط منفی و مضر میشود (Heggelund و همکاران ۲۰۱۴).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین غلظت نانوذرات و مرگ و میر کرم‌ها پس از تیمار بسترها در پایان یک دوره ۷۵ روزه وجود داشت. با افزایش سطح نانو ذرات تعداد کرم در بستر به ترتیب از تیمار T_2 تا T_9 ۳۳/۵۷، ۳۷/۱۴، ۴۰/۷۱، ۴۰/۶۹، ۴۸/۹۲، ۵۳/۵۷، ۵۶/۰۷ و ۶۰/۷۱ (به طور متوسط ۴۶/۴۳ ٪) درصد نسبت به شاهد (T_1) کاهش داشت. همچنین میزان تولید کوکون یا در واقع نرخ تولید مثل نیز به ترتیب ۲/۳۹، ۴/۹۲، ۸/۴۲، ۱۸/۲۹، ۲۲/۸۸، ۳۳/۷۳، ۳۶/۱۵ و ۳۴/۹۲ (به طور متوسط ۲۰/۲۱ ٪) درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش داشت. نتایج این مطالعه حاکی از اثرات

سمی نانو ذرات بر کرم خاکی بوده و میتواند هشداری برای کاربرد بیش از نیاز کودهای شیمیایی حاوی این ذرات در تولید محصولات زراعی باشد که منجر به رهاسازی این ذرات در محیط زیست و اکوسیستم موجودات خاکزی از جمله کرم خاکی خواهد شد.

منابع

Coleman, J. C., Johnson, D. R., Stanley, J. K., Bednar, A. J., Weiss, C. A. J., Boyd, R. E. and Steevens, J. A. 2010. Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, Eisenia fetida. Journal of Environmental Toxicology and Chemistry, 29(7), 1575-1580.

Gogoi, S. K., Gopinath, P., Paul, A., Ramesh, A., Ghosh, S. S. and Chattopadhyay, A. 2006. Green fluorescent protein-expressing Escherichia coli as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. Journal of Langmuir, 22, 9322-9328.

Heggelund, L. R., Diez-Ortiz, M., Lofts, S., Lahive, E., Jurkschat, K., Wojnarowicz, J. Svendsen, C. 2014. Soil pH effects on the comparative toxicity of dissolved zinc, non-nano and nano ZnO to the earthworm Eisenia fetida. Nanotoxicology, 8(5), 559-572.

Hu, C. W., Li, M., Cui, Y. B., Li, D. S., Chen, J. and Yang, L. Y. 2010. Toxicological effects of TiO_2 and ZnO nanoparticles in soil on earthworm Eisenia fetida. Journal of Soil Biology and Biochemistry, 42(4), 586-591.

Kelly, S. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H. and Levin, E. D. 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. Journal of Environmental Health Perspectives, 106, 375-384.

Landrum, M., Canas J. E., Coimbatore, G., Cobb, G. P., William, A. J., Baohong, Z. and Todd, A. A. 2006. Effects of perchlorate on earthworm (Eisenia fetida) survival and reproductive success. Journal of Science of the Total Environment, 363(1-3), 237-244.

Lapied, E., Moudilou, E., Exbrayat, J. M., Oughton, H., and Joner, E. J. 2010. Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm Lumbricus terrestris (Oligochaeta). Nanomedicine, 5, 975-84.

Lebedev, S., Yausheva, E., Galaktionova, L. and Sizova, E. 2015. Impact of Zn Nanoparticles on Growth, Survival and Activity of Antioxidant Enzymes in Eisenia Fetida. Modern Applied Science, 9(10), 34-44.

Nel, A., Xia, T., Madler, L. and Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Journal of Science, 311, 622-627.

Ramirez, H., Bracho, B. and Faria, A. 1999. Caracterizacion del crecimiento de la lombriz roja (Eisenia spp), bajo Condiciones de clima calido, Rev. Journal of Revista de la Facultad de Agronomía. Maracay 25(2), 139-147.

Roco, M. C. 2005. The emergence and policy implications of converging new Technologies integrated from the nanoscale. Journal of Nanoparticle Research, 7(2-3), 129-143.

Smith, K. 1998. Practical guide to raising earthworm (basic vermiculture information) K.W. rabbit and worm. Journal of Bioresource Technology, 84, 191-196.

Zaltauskaite, J. and Sodiene, I. 2010. Effects of total cadmium and lead concentrations in soil on the growth reproduction and survival of earthworm Eisenia fetida. Ekologija, 56(1-2), 10-16.

Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M. and York, D. 2007. Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of ZnO Nanoparticles (ZnO nanofluids). Journal of Nanoparticle Research, 9, 479- 489.

Topic for submission: Ecosystem Pollution, Human Health and Bioremediation

Effect of CuO, ZnO and FeO Nanoparticles on Eisenia fetida Earthworm survive

Zarei [1], M., Ahmadabadi *[1], Z., Sadegh Kasmaei, L[2].

[1] Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Iran
[2] PhD candidate, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Iran

Abstract

In order to investigate the effect of three nanoparticles (NPs) on some properties of earthworm (Eisenia fetida), a study was carried out based on completely randomized blocks design with three replications. Treatments comprised different levels of NPs including CuO, ZnO and FeO which were investigated through nine different treatments. After preparing substrate, adult worms were added to 2kg pots. The solution of NPs was added to substrates. The substrates were kept under conditions of 25 0C and 70% of FC for 75 days. At the end of period, the effect of NPs on worms` weight, mortality, cocoons` number and cocoons` weight were determined. The results indicated that by increasing NPs, worms` number and weight and cocoons` number decreased compared to the control. The results of this study also indicate that the toxic effects of nanoparticles on the earthworm and can be as a warning for the increasing application and releasing of these particles through the environment and ecosystem of soil organisms, including earthworms.

Keywords: Soil organisms, Environment, worms` weight.

* Corresponding author, Email: Zahra.ahmadabadi@yahoo.com