محور مقاله: آلودگی زیست‌بوم، سلامت انسان و زیست‌پالایی

اثر نانو ذرات و نیترات نقره بر فعالیت آنزیم اوره آز به‌عنوان شاخصی از چرخه‌ی نیتروژن در یک خاک آهکی

احمد بازوبندی[۱*]، امیر فتوت[۲]، اکرم حلاج نیا[۳]، نرگس عابدین زاده[۴]، الهام خاکزار[۴]

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲] دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

کاربرد گسترده نانو ذرات نقره در بخش‌های مهم صنعتی می‌تواند زنگ خطر جدی برای محیط‌زیست باشد، چراکه خاصیت ضد باکتریایی و ضد میکروبی این نانوذره به‌صورت انتخابی عمل نمی‌کند و می‌تواند طیف گسترده‌ای از ریز جانداران مفید موجود در محیط‌های آبی و خاکی را در معرض خطرات جدی قرار دهد. از طرفی یکی از مهم‌ترین شاخص‌های بیولوژیکی خاک فعالیت آنزیمی خاک است، دراین‌بین نیتروژن یکی از مهم‌ترین عناصر موردنیاز گیاه بوده و چرخه این عنصر وابستگی زیادی به ریز جانداران خاک دارد. با استناد به این موارد و همچنین فرضیات کلی، مطالعه‌ی حاضر اثرات این نوع نانوذره را در مقایسه با شکل نمکی آن (نیترات نقره) موردبررسی قرارداد. در این میان با توجه به اهمیت مدت‌زمان حضور نانو ذرات در محیط خاک این پارامتر هم به‌عنوان یک عامل مهم در نظر گرفته شد. نتایج حاصل نشان داد که شکل نانوذره نقره نسبت به شکل نمکی (نیترات نقره) بازدارندگی بیشتری برای فعالیت‌های آنزیمی اوره آز داشته است. همچنین مشاهده شد هرچه زمان حضور نانو ذرات و حتی نیترات نقره در خاک بیشتر باشد میزان اثرگذاری آن بر فعالیت آنزیمی هم بیشتر است.

کلمات کلیدی: آنزیم اوره آز، چرخه‌ی نیتروژن، نانو ذرات نقره، نیترات نقره.

مقدمه

فناوری ابزار جدیدی برای حل مشکلات ساده و پیچیده فراهم می‌کند و امروزه، نانوتکنولوژی مجموعه‌ای از تکنیک‌ها، روش‌ها و محصولاتی را برای پیشرفت‌های جدید در چندین زمینه کلیدی مانند پزشکی، مهندسی، کشاورزی و دریایی ارائه می‌دهد. نانو مواد به مواد طبیعی و یا مصنوعی که حداقل یک بعد خارجی از آن بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشد و سطح حجم مشخصی از آن بیشتر از ۶۰ مترمربع (توصیه‌ی کمیسیون نانو مواد اروپا در تاریخ ۱۸ اکتبر ۲۰۱۱) باشد گفته می‌شود. به دلیل خصوصیات منحصربه‌فرد نانو مواد، معمولاً در کاربردهای مختلفی مورداستفاده قرار می‌گیرند. نقره یک فلز گران‌بهای طبیعی است و در انواع فعالیت‌های کاربردی مانند پزشکی، اثاث منزل، ظروف غذا، جواهرات، سکه، پارچه و مواد ساختمانی حتی در تمدن‌های باستانی استفاده‌شده است (Abraham 2015) در مقیاس نانو مواد دارای خواص منحصربه‌فرد فوق‌العاده‌ای‌اند که در حالت توده‌ای مواد دیده نمی‌شود (Hiemstra 2018). با ورود فناوری نانو در بخش صنعت و تولید نانو نقره استفاده از این فلز به‌شدت افزایش پیداکرده است، اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضدویروسی نانو ذرات نقره باعث شده است که امروزه این ماده جزء اصلی، تقریباً تمامی محصولات بهداشتی و بخش اعظمی از دیگر محصولات تولیدی برای مثال بسته‌بندی مواد غذایی، فیلترهای آب، لباس، افشانه‌ها خوشبوکننده، شوینده‌ها، ماشین‌های لباسشویی، رنگ‌ها، صابون‌ها و انواع لوسیون، ابزار جراحی، وسایل ایمپلنت، محصولات بهداشتی، صوت و تصویر و ... در سراسر جهان باشد (Abraham 2015). استفاده از نانو ذرات در محصولات مختلف و به‌تبع آن ورود این مواد به محیط‌زیست (Zhang و همکاران ۲۰۱۶) باعث به وجود آمدن این سؤال می‌شود که آیا وجود این ذرات در محیط‌زیست و به‌خصوص خاک بدون خطر خواهد بود؟ برای پاسخ به این سؤال باید جنبه‌های مختلف زیست‌محیطی را در نظر گرفت. خصوصیات ضد میکروبی نانو ذرات نقره یکی از عوامل اصلی نگرانی جامعه علمی در خصوص ورود این ماده به خاک است چراکه وجود ریز جانداران خاک از عوامل مهم کیفیت و سلامت خاک است، حال‌آنکه حضور این نانو مواد می‌تواند باعث از بین رفتن بخش زیادی از ریز جانداران مفید خاک، کرم‌های خاکی (Schlich و همکاران ۲۰۱۳) ، آنزیم‌ها (Rahmatpour و همکاران ۲۰۱۷) و آسیب به گیاهان مختلف (Zuverza-Mena و همکاران ۲۰۱۶) شود. از طرفی آنزیم‌های خاک از طریق واکنش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی بسیار، نقش حیاتی در فرآیندهای خاک مانند چرخه غذایی و تبدیل انرژی بازی می‌کنند.

* ایمیل نویسنده مسئول: bazoobandi.ahmad@mail.um.ac.ir

محققین مختلفی آنزیم‌های خاک را به‌عنوان شاخص‌های قابل‌استفاده برای آلودگی، حاصلخیزی، سلامت و بلوغ خاک پیشنهاد کرده‌اند (Machulla, Bruns, and Scow 2005). ازجمله دلایل اصلی این رویکرد می‌توان به ارتباط نزدیک آنزیم‌های خاک با ماده آلی و ویژگی‌های فیزیکی و بیولوژیکی خاک، سهولت در اندازه‌گیری و پاسخ سریع آن‌ها به تغییرات در مدیریت خاک اشاره کرد. میزان فعالیت آنزیم‌های خاک وابسته به روند و شدت فرآیندهای بیوشیمیایی بوده و تحت تأثیر نوع خاک، نوع کاربری، پوشش گیاهی و طرح مدیریتی خاک قرار دارد. یکی از دلایل عمده تفاوت در میزان فعالیت آنزیم‌ها در خاک‌های مختلف، نوع خاک است. چراکه این عامل به‌نوعی بر سطح مواد آلی خاک، ترکیب و فعالیت میکروارگانیسم‌ها تأثیر دارد. طبیعتاً قدم اول در فهم رفتار نانو ذرات در محیط‌های خاکی، شناخت رفتار نانو ذرات در خاک‌های مختلف است. ازآنجاکه پروژه‌ی نانو نقره، افق جدیدی در علم شیمی خاک است و بیشتر مطالعات انجام‌شده در کشورهای اروپایی و خاک‌هایی با ماده آلی بالا انجام‌شده است، نمی‌توان رفتار این نانو ذرات را به اقلیم‌های خشک با خاک‌های آهکی تعمیم داد. بر این اساس مطالعه حاضر باهدف شناخت رفتار و اثرگذاری این نانو ذرات در خاک‌های آهکی بر اوره آز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های خاک انجام خواهد شد.

مواد و روش‌ها

سنتز نانو ذرات خاک

نانو ذرات نقره سنتز شده از روش‌های مختلف، اندازه، شکل و ریخت‌شناسی‌های مختلفی دارد و برای کاربردهای مختلفی به کار گرفته می‌شود. باید گفت که در اینجا سنتز نانو نقره از روش احیا و آن‌هم نوع خاص احیای شیمیایی، مطالعه و بررسی‌شده است. در مطالعه‌ی حاضر از سیترات سدیم به‌عنوان احیاکننده استفاده شد همچنین سیترات عامل پایدارکننده نانو ذرات بوده و از فولیکولِ شدن نانو ذرات در محیط سوسپانسیون جلوگیری می‌کند.

اعمال تیمارهای آزمایشی

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار انجام‌شده است. فاکتورهای آزمایش شامل زمان (سه ماه و صفر)،نوع نقره استفاده شده (نیترات نقره و نانو ذرات نقره) و سه سطح غلظتی (۵، ۲۵ و ۱۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) در سه تکرار، بوده است. با مخلوط کردن سوسپانسیون حاوی نیترات و نانو ذرات نقره با خاک موردنظر و نگهداری آن‌ها در ظروف پلاستیکی مخصوص درب دار به مدت سه ماه و همچنین برای زمان صفر مخلوط کردن نانو ذرات در زمان انجام نمونه‌برداری برای بررسی میزان فعالیت آنزیمی اوره آز مطالعه‌ی حاضر شروع شده است. پس از نمونه برداری از خاک و انتقال به آزمایشگاه، نمونه ها در دمای ۴ درجه نگهداری شدند. سپس در روز بعد مقدار فعالیت آنزیمی با استفاده از روشی که در ادامه شرح داده خواهد شده اندازه گیری شد.

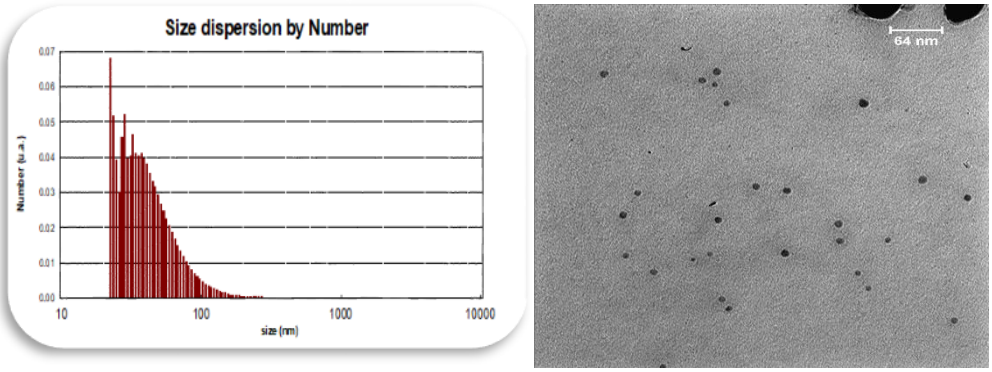
اندازه‌گیری آنزیم اوره آز

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم اوره آز ابتدا ۵ گرم خاک با ۰/۲ میلی‌لیتر تولوئن (به جهت توقف فعالیت‌های میکروبی) تیمار شده و سپس ۹ میلی‌لیتر بافر تریس (تریس هیدروکسی متیل آمینو متان، pH=۷) و یک میلی‌لیتر محلول ۰/۲ مولار اوره به آن افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. پس از انکوباسیون ۳۵ میلی‌لیتر محلول KCl-Ag_2SO_4 (۲/۵ مولار نسبت به KCl و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به Ag_2SO_4) به آن افزوده شده، سپس ظرف در دمای اتاق سرد شد و بعدازآن، سوسپانسیون خاک را با محلول KCl-Ag_2SO_4 به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و سپس مقدار آمونیوم آزادشده در مخلوط خاک به روش تقطیر با بخار آب تعیین شد (Keeney and Nelson 1982). برای این کار ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به ظرف تقطیر منتقل‌شده و ۰/۲ گرم اکسید منیزیم فوراً به آن افزوده شد و در دستگاه کجدال قرار داده شد. سپس محلول به‌دست‌آمده با اسیدسولفوریک ۰/۰۰۱ نرمال تیتر شد.

نتایج و بحث

مشخصات نانو ذرات نقره

شکل ۲ نشان‌دهنده‌ی توزیع اندازه ذرات نانو ذرات نقره در محدوده‌ی نانو است، همان‌طور که مشاهده می‌شود اکثریت ذرات در محدوده‌ی ۴۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند. از طرف دیگر شکل ۱ تأیید مناسبی برای اندازه ذرات است. همان‌طور که در شکل نشان داده‌شده ذرات نتنها در محدوده نانو قرار دارند بلکه هیچ تجمع یا اگلومره شدنی هم در ذرات دیده نمی‌شود.



شکل ۱. نمودار مربوط به‌اندازه نانو ذرات (اندازه‌گیری شده توسط دستگاه PSA[1]) و تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM[2]) نانو ذرات سنتز شده

خصوصیات خاک

خصوصیات فیزیک و شیمیایی خاک‌های استفاده‌شده در این مطالعه در جدول ۱ مشخص‌شده است. با توجه به داده‌های جدول و با استفاده از روش تیتراسیون به‌وسیله‌ی اسیدکلریدریک، میزان آهک ۱۵ درصد به‌دست‌آمده و مشخص شد این خاک جز خاک‌های آهکی است، بافت خاک با استفاده از روش هیدرومتری، لومی به‌دست آمد ، همچنین pH با استفاده از پی اچ متر در عصاره اشباع اندازه‌گیری شده و در محدوده‌ی خنثی بوده است، ازنظر نمک‌های محلول میزان EC با استفاده از ای سی متر در عصاره اشباع تعیین و مشخص شد خاک در محدوده‌ی غیر شور است. میزان کربن آلی نیز بسیار محدود بود.

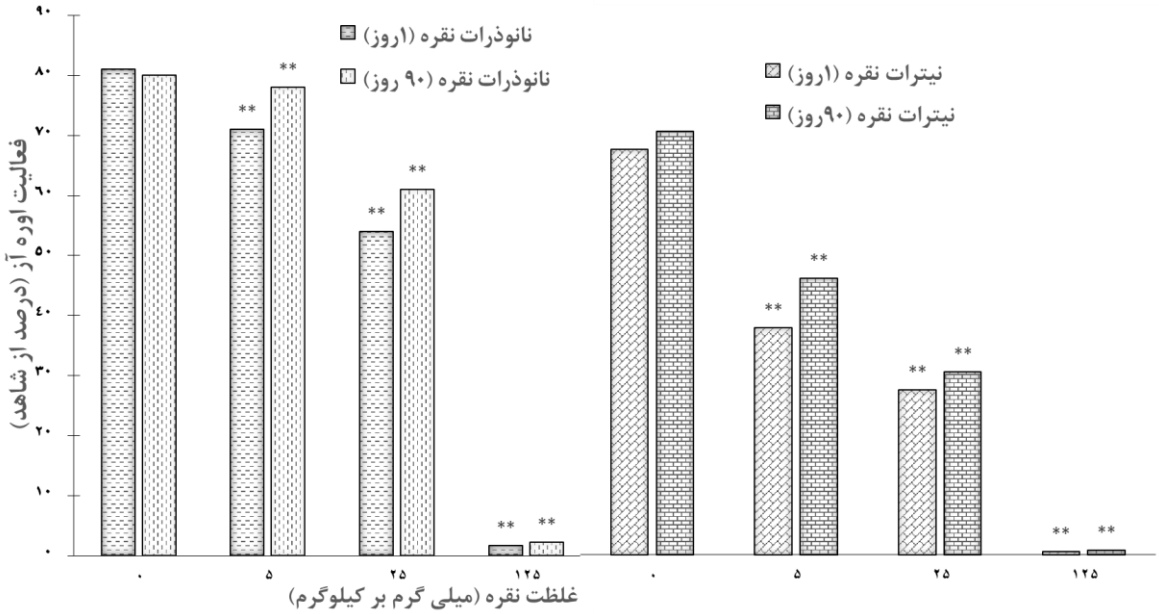
جدول ۱. خصوصیات خاک استفاده‌شده در این مطالعه.

پارامتر	درصد رس	درصد شن	درصد سیلت	درصد آهک	درصد کربن آلی	EC (دسی زیمنس بر متر)	pH
	۲۰	۳۵	۴۵	۱۵/۴	۰/۵۸۵	۲/۴	۷/۴

اثرات نانو ذرات نقره و نیترات نقره بر فعالیت آنزیم اوره آز

نتایج مقایسه میانگین نشان می دهد که با افزایش غلظت نانو ذرات و نیترات نقره فعالیت آنزیمی اوره آز کاهش‌یافته است (جدول ۲). نکته‌ی قابل‌توجه اثر بیشتر نانو ذرات نقره نسبت به نیترات نقره در کاهش فعالیت آنزیمی بوده است. در همین زمینه Rahmatpour و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که نانو ذرات نقره نسبت به نیترات نقره در فعالیت آنزیمی اوره آز و دهیدروژناز اثر بازدارندگی بیشتری داشته‌اند. همچنین در مطالعه‌ای (Peyrot و همکاران ۲۰۱۴) به بررسی اثرات نانو ذرات و یون نقره بر فعالیت آنزیمی پرداختند، آن‌ها گزارش کردند که اثرات نانو ذرات نقره نسبت به یون نقره به‌شدت بازدارنده‌تر بوده است. بازدارندگی فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی توسط نانو ذرات ممکن است به دلیل اثرات منفی نانو ذرات نقره و یا یون‌های آزاد نقره باشد (Morones و همکاران ۲۰۰۵). اما بااین‌حال برخی از شواهد نشان می‌دهد که اثرات بازدارندگی نانو ذرات نقره برای فعالیت آنزیمی بیشتر به دلیل خصوصیات خود نانو ذرات است (Peyrot و همکاران ۲۰۱۴ ؛ Shin, Kwak, and An 2012). همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده‌شده است اثرات بازدارندگی نانو ذرات نقره و نیترات نقره که ۹۰ روز در حالت ظرفیت زراعی قرارگرفته‌اند نسبت به خاک‌هایی که به‌تازگی به نانو ذرات و نیترات نقره آلوده‌شده‌اند بیشتر بوده است این مسئله را می‌توان به اثرات بلندمدت نانو ذرات نقره ربط داد، احتمالاً حل شدن کامل نانو ذرات در خاک به زمان نیاز داشته و پس از انحلال کامل نانو ذرات و همچنین نیترات نقره اثرات بازدارندگی بیشتری از خود نشان خواهند داد. همچنین امکان از بین رفتن پوشش نانو ذرات نقره و آزاد شدن یون‌های نقره در فواصل زمانی طولانی‌تر بیشتر بوده و اثرات یون‌های آزاد ممکن است باعث کاهش فعالیت آنزیمی اوره آز شود (Hiemstra 2018). این مسئله تأییدکننده این اصل است که باید در آنالیز اثرات بازدارندگی فلزات محلول و همچنین نانو ذرات برای فعالیت‌های آنزیمی اثر عمر را نیز در نظر گرفت (Rahmatpour و همکاران ۲۰۱۷) .

[1] Particle Size Analyzer
[2] Transmission Electron Microscopy



شکل ۲. فعالیت آنزیم اوره آز تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت نانو ذرات نقره و نیترات نقره و دو زمان ظرفیت زراعی (یک روز و سه ماه) که به شکل درصدی از میانگین در شاهد بیان‌شده است. ستاره‌ها نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین تیمار و شاهد (تست توکی؛ $P<0.01$)

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس مالچ کاه و کلش گندم بر مقدار متوسط رطوبت خاک در طی دوره آزمایش

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
نوع نقره	۱	۳۰/۴۳	۰/۰۱۵۶ *
سطح غلظت	۲	۲۹/۰۶	۰/۰۰۵۷ *
زمان	۱	۱۵/۳۴	۰/۰۷۱*
خطای آزمایش	۲۴	۴/۴۹	-
اثر متقابل نوع و سطح	۲	۷/۷۸	۰/۱۹۸*
اثر متقابل نوع و زمان	۱	۱/۶۴	۰/۵۵*
اثر متقابل سطح و زمان	۱	۱۳/۲۴	۰/۰۷*
اثر سطح، نوع و زمان	۲	۸/۵۸	۰/۱۷ns

ns و *: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر باهدف مقایسه‌ی اثرات نانو ذرات و نیترات نقره در دو زمان صفر و ۹۰ روز بر فعالیت آنزیم اوره از در خاک انجام شد. نتایج نشان داد که اثر بازدارندگی نانو ذرات نقره به‌مراتب بیشتر از نیترات نقره بوده است که این مسئله احتمالاً به دلیل خصوصیات ویژه نانو ذرات مانند سطح ویژه بالا و واکنش‌پذیری بیشتر آن است. از طرف دیگر با مقایسه‌ی زمان حضور نانو ذرات و نیترات نقره در خاک، مشخص شد که هرچه زمان حضور نانو ذرات و نیترات نقره در خاک بیشتر باشد احتمالاً به دلیل انحلال کامل آن‌ها و همچنین آزادسازی یون‌های نقره از نانو ذرات اثر بازدارندگی بیشتری برای فعالیت‌های آنزیمی از خود نشان می‌دهند.

منابع

Abraham, Priya Mary. 2015. “Attachment of Engineered Silver Nanoparticles to Collector Surfaces-A Batch Sorption Study

Using Model and Environmental Surfaces."

Hiemstra, Tjisse. 2018. "Surface Structure Controlling Nanoparticle Behavior: Magnetism of Ferrihydrite, Magnetite, and Maghemite." *Environmental Science: Nano* 5 (3): 752–64. https://doi.org/10.1039/c7en01060e.

Keeney, Dennis R, and D Wl Nelson. 1982. "Nitrogen—Inorganic Forms 1." *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, no. methodsofsoilan2: 643–98.

Machulla, Galina, Mary Ann Bruns, and Kate M Scow. 2005. "Microbial Properties of Mine Spoil Materials in the Initial Stages of Soil Development." *Soil Science Society of America Journal* 69 (4): 1069–77.

Morones, Jose Ruben, Jose Luis Elechiguerra, Alejandra Camacho, Katherine Holt, Juan B Kouri, Jose Tapia Ramírez, and Miguel Jose Yacaman. 2005. "The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles." *Nanotechnology* 16 (10): 2346.

Peyrot, Caroline, Kevin J Wilkinson, Mélanie Desrosiers, and Sébastien Sauvé. 2014. "Effects of Silver Nanoparticles on Soil Enzyme Activities with and without Added Organic Matter." *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (1): 115–25.

Rahmatpour, Samaneh, Mehran Shirvani, Mohammad R. Mosaddeghi, Farshid Nourbakhsh, and Mehdi Bazarganipour. 2017. "Dose–Response Effects of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate on Microbial and Enzyme Activities in Calcareous Soils." *Geoderma* 285: 313–22. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.10.006.

Schlich, Karsten, Thorsten Klawonn, Konstantin Terytze, and Kerstin Hund-Rinke. 2013. "Hazard Assessment of a Silver Nanoparticle in Soil Applied via Sewage Sludge." *Environmental Sciences Europe* 25 (1): 17. https://doi.org/10.1186/2190-4715-25-17.

Shin, Yu-Jin, Jin Il Kwak, and Youn-Joo An. 2012. "Evidence for the Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles on the Activities of Soil Exoenzymes." *Chemosphere* 88 (4): 524–29.

Zhang, Xin, Chuan-Wang Yang, Han-Qing Yu, and Guo-Ping Sheng. 2016. "Light-Induced Reduction of Silver Ions to Silver Nanoparticles in Aquatic Environments by Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS)." *Water Research* 106: 242–48.

Zuverza-Mena, Nubia, Raul Armendariz, Jose R. Peralta-Videa, and Jorge L. Gardea-Torresdey. 2016. "Effects of Silver Nanoparticles on Radish Sprouts: Root Growth Reduction and Modifications in the Nutritional Value." *Frontiers in Plant Science* 7 (February): 1–11. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00090.

Topic for submission: Ecosystem Pollution, Human Health and Bioremediation

Effect of AgNPs and $AgNO_3$ on soil urease activities as nitrogen cycle index in calcareous soil

Bazoobandi*[1], A., Fotovat[2], A., Halajnia, .[3] N., Abedinzadeh, Khakzar, E. [4]

[1] PhD. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran

[2] Associate Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran

[3] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran

[4] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Abstract

The widespread use of silver nanoparticles in important industrial section can be a serious environmental hazard since the antibacterial and antimicrobial properties of this nanoparticle are not selective and can threat a wide range of beneficial microorganisms in the aquatic and terrestrial environments and expose them to serious risks. On the other hand, soil enzyme activity is one of the most important biological indices of soil. Nitrogen is one of the most important elements for the plant, and the cycle of this element depends on soil microorganisms. Based on these and general assumptions, the current study examined the effects of this type of nanoparticle in comparison to its salt form (silver nitrate). Considering the importance of the presence of nanoparticles in the soil environment, this parameter was considered as an important factor. The results showed that the silver nanoparticle shape was inhibitorier to urease enzyme activity than salt form (silver nitrate). It was also observed that if the presence of nanoparticles and even silver nitrate in soil last for longer time, it will be more affective on soil enzymatic activity.

Keywords: Enzymatic activity, Nitrogen cycle, silver nanoparticles, silver nitrate.

* Corresponding author, Email: bazoobandi.ahmad@mail.um.ac.ir