

## The Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Reduction of Arsenic Effect on Respiration and Soil Ecophysiological Indices in a Soil with Different Levels of Arsenic

NADER KHADEM MOGHADAM IGDELOU<sup>1\*</sup>, AHMAD GOLCHIN<sup>1</sup>, AHMAD BYBORDI<sup>2</sup>, ALI BEHESHTI ALE AGHA<sup>3</sup>

1. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

2. Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), East Azarbaijan, Tabriz, Iran.

3. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, Iran.

(Received: Oct. 24, 2019- Revised: March. 4, 2020- Accepted: Dec. 5, 2020)

### ABSTRACT

Due to the increasing development of nanotechnology, its use has increased in all fields, especially in the field of environmental pollution as an absorbent. For this purpose, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with two factors; arsenic factor at four levels (0, 25, 50 and, 100 mg/kg) and TiO<sub>2</sub> factor at three levels (0, 0.25 and, 0.5% by weight) and three replications in the laboratory and in a dark room at 25°C for 8 months using the 1.3 L respiratory jars. Cumulative respiration percentile results showed that the highest respiration control treatment matched with 50 mg/kg arsenic plus 0.5% TiO<sub>2</sub> (w/w). The highest and the lowest respiration rates were obtained in the first and eighth months of incubation, respectively, with control and 25 mg/kg arsenic with a difference of 33.78%. As the nanoparticle levels increased, the respiration rate increased, so that the highest respiration rate was obtained in the first month of 0.5% TiO<sub>2</sub> treatment. The highest and the lowest MBC, as well as *q*<sub>mic</sub>, was obtained in 100 mg/kg arsenic treatments plus 0.25% TiO<sub>2</sub> (w/w) and 50 mg/kg arsenic plus 0.5% TiO<sub>2</sub> (w/w), respectively. Conversely, the highest and the lowest *q*CO<sub>2</sub> were obtained from 50 mg/kg arsenic plus 0.5% TiO<sub>2</sub> (w/w) and 100 mg/kg arsenic with 0.5% TiO<sub>2</sub> (w/w), respectively. Cluster analysis of the variables showed that the MBC and *q*<sub>mic</sub> variables were the first cluster and the second, third, and fourth clusters were the BR, *q*CO<sub>2</sub>, and cumulative respiration, respectively. According to the results of this study, the application of 0.5% TiO<sub>2</sub> (w/w) can reduce the toxic effects of arsenic and improved BR, cumulative respiration rate, and monthly respiration.

**Keywords:** Cumulative Diagram, Euclidean Distance, Hierarchical Cluster Analysis, Metabolic Quotient, Microbial Quotient.

## تأثیر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در کاهش اثر آرسنیک بر تنفس و شاخص‌های اکوفیزیولوژیک در خاکی با سطوح مختلف آرسنیک

نادر خادم مقدم ایگدهلو<sup>۱\*</sup>، احمد گلچین<sup>۱</sup>، احمد بایبوردی<sup>۲</sup>، علی بهشتی آل آقا<sup>۳</sup>

۱. گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران.

۲. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آذربایجان غربی، ایران.

۳. گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۲ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۱۲/۱۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۹/۱۵)

### چکیده

به‌موجب توسعه روز افزون نانوفناوری، استفاده از آن در همه زمینه‌ها به‌ویژه در زمینه آلودگی‌های زیست‌محیطی به‌عنوان جاذب افزایش یافته است. بدین منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور، فاکتور آرسنیک در چهار سطح (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg) و فاکتور نانوذره TiO<sub>2</sub> در سه سطح (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد وزنی نانوذره) و با سه تکرار در آزمایشگاه و در اتاقی تاریک با ۲۵°C و در مدت ۸ ماه و با استفاده از ظروف تنفس ۱/۳ L به اجرا درآمد. نتایج درصد تنفس تجمعی نشان داد که بیش‌ترین مطابقت تنفس تیمار شاهد با تیمار ۵۰ mg/kg آرسنیک به‌همراه ۰/۵ درصد وزنی نانوذره به‌دست آمد. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان تنفس به‌ترتیب در ماه‌های اول و هشتم انکوباسیون از تیمارهای شاهد و ۲۵ mg/kg آرسنیک با اختلاف ۳۳/۷۸ درصد حاصل شد. با افزایش سطوح نانوذره میزان تنفس نیز افزایش یافت به‌طوری که بیش‌ترین میزان تنفس در ماه اول و از تیمار ۰/۵ درصد وزنی نانوذره به‌دست آمد. بیش‌ترین و کم‌ترین کربن زیست‌توده میکروبی و هم‌چنین کسر میکروبی به‌ترتیب از تیمارهای ۱۰۰ mg/kg آرسنیک به‌همراه ۰/۲۵ درصد وزنی نانوذره و ۵۰ mg/kg آرسنیک به‌همراه ۰/۵ درصد وزنی نانوذره حاصل شد و برعکس، بیش‌ترین و کم‌ترین کسر متابولیکی به‌ترتیب از تیمارهای ۵۰ mg/kg آرسنیک به‌همراه ۰/۵ درصد وزنی نانوذره و ۱۰۰ mg/kg آرسنیک به‌همراه ۰/۲۵ درصد وزنی نانوذره به‌دست آمد. تحلیل خوشه‌ای متغیرها نشان داد که متغیرهای کربن زیست‌توده میکروبی و کسر میکروبی در خوشه اول قرار گرفتند و در خوشه‌های دوم، سوم و چهارم نیز به‌ترتیب متغیرهای تنفس پایه، کسر متابولیکی و تنفس تجمعی قرار گرفتند. مطابق با نتایج این پژوهش، کاربرد ۰/۵ درصد وزنی نانوذره توانست اثرات سمی آرسنیک را کاهش داده و تنفس پایه، درصد تجمعی تنفس و تنفس ماهیانه را بهبود بخشد.

**واژه‌های کلیدی:** تحلیل خوشه‌ای سلسله‌مراتبی، فاصله اقلیدسی، کسر متابولیکی، کسر میکروبی، نمودار تجمعی.

### مقدمه

با پیشرفت سریع صنایع گوناگون مانند معدن‌کاوی، ذوب فلزات، ساخت کود، ساخت آفت‌کش‌ها و صنایع پتروشیمی، فلزهای موجود در پساب این صنایع به‌گونه مستقیم و غیرمستقیم به‌طور فزاینده‌ای وارد محیط‌زیست شده‌اند (Ansari and Malik, 2007). فلزات سنگین حتی در غلظت‌های کم، سمی، سرطان‌زا و یا جهش‌زا هستند (Shirzadeh et al., 2013). فلزات سنگین بیش‌تر از راه تغییر تنوع گونه‌ای و فعالیت ریزجانداران، بر بوم‌شناسی میکروبی خاک موثر واقع می‌شوند (Frostegård and Bååth, 1996). بررسی وضعیت آلودگی منابع آب و خاک کشور به فلز سنگینی مانند آرسنیک (As) نشان داده که در استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، کردستان و کرمان آلودگی

آرسنیک این منابع به‌شدت بالا بوده و نیازمند توجه ویژه‌ای هستند (Khadem Moghadam Igdellou and Golchin, 2019). اندازه‌گیری کمی ویژگی‌های بیولوژیک خاک مانند کربن زیست‌توده میکروبی، تنفس، فعالیت‌های آنزیمی و ATP برای بررسی پیامد فلزات سنگین بر میکروفلورای خاک می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Shirzadeh et al., 2013). تنفس و زیست‌توده میکروبی از مهم‌ترین ویژگی‌ها و شاخص‌ها در تحول و تکوین خاک و فرایندهای مهم اکوسیستم نظیر چرخه جهانی کربن، چرخه عناصر غذایی و اصلاح‌زیستی به‌شمار می‌آیند (Austin et al., 2004). ریزجانداران خاک کارکرد ویژه‌ای در چرخه عناصر غذایی و تغذیه گیاه، پیدایش و نگهداری ساختمان خاک، سم‌زدایی مواد شیمیایی زیانبار، کاهش بیماری‌های گیاهی و رشد

نانوفناوری یکی از نویدبخش‌ترین فناوری‌ها در قرن بیست و یکم می‌باشد که یکی از کاربردهای مهم آن استفاده از نانوجاذب‌ها برای حذف آلاینده‌های خاک است. نانوذرات اکسیدفلزی و به‌ویژه نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ( $\text{TiO}_2$ ) جاذب‌های خوبی در تیمارهای آلودگی‌زدایی خاک، رسوبات و آب‌ها به‌شمار می‌روند (Aryabod *et al.*, 2017). مهم‌ترین مزیت استفاده از نانوذرات به‌عنوان جاذب، تولید آسان با هزینه کم، استفاده به‌مقدار کم ( $1 \text{ g/L}$ ) و ظرفیت بالای جذب به‌دلیل سطح ویژه بالای آن‌ها می‌باشد (Zhang *et al.*, 2010). دی‌اکسیدتیتانیوم خواص متعددی مانند پایداری شیمیایی، عدم ایجاد سمیت و مقاومت در برابر خوردگی، قدرت اکسیدکنندگی زیاد، رداکس انتخابی، تمایل زیاد به واکنش با آرسنیک و ظرفیت بالای آن برای فتواکسیداسیون ( $\text{As(III)}$  به  $\text{As(V)}$ ) دارد (Lata and Samadder, 2016). از بین سه شکل بلوری نانوذرات  $\text{TiO}_2$  (آناناز<sup>۴</sup>، روتیل<sup>۵</sup> و بروکیت<sup>۶</sup>)، آناناز به‌علت اندازه ریز و سطح ویژه بیشتر، توانایی بیش‌تری برای جذب فلزات سنگین از خاک دارد. از مزیت این نانوذرات نسبت به سایر نانوذرات می‌توان به جذب بیش‌تر شبه فلز آرسنیک از خاک، آسان بودن روش ساخت اشاره کرد، هم‌چنین این نانوذرات از شناخته شده‌ترین نانوذرات هستند و از موادی ساخته می‌شوند که تحقیقات بسیاری روی آنها انجام شده است. از دیگر مزایای این نانوذرات در بخش کشاورزی می‌توان به اثرات سودمند آنها بر رشد، فیزیولوژی و فعالیت‌های متابولیسمی گیاهان اشاره کرد که می‌توانند جذب سایر عناصر غذایی از جمله نیتروژن، فسفر، کلسیم، منیزیم، آهن، منگنز و روی را توسط گیاهان بهبود بخشند (Khadem Moghadam and Igdellou and Golchin, 2018). بیش‌ترین تولید نانوذراتی با پایه فلزی<sup>۷</sup> شامل  $\text{nZnO}$ ،  $\text{nTiO}_2$ ،  $\text{nAu}$ ،  $\text{nAg}$ ،  $\text{nCeO}_2$  و  $\text{nCu}$  است که در این بین نانوذرات  $\text{TiO}_2$  دومین جایگاه را به خود اختصاص داده است (Khadem Moghadam Igdellou *et al.*, 2019).

هدف از این پژوهش بررسی تأثیر آلودگی آرسنیک بر میزان تنفس و تغییرات آن به‌صورت ماهیانه و شاخص‌های اکوفیزیولوژیک خاک و تغییرات تحمل ریزجانداران خاک مورد آزمایش در دوره‌های پس از آلودگی خاک و هم‌چنین پیامد افزودن نانوذره  $\text{TiO}_2$  بر جامعه ریزجانداران و کاهش اثرات سمی این فلز بر شاخص‌های اکوفیزیولوژیک و تنفس است.

گیاه دارند (Filip, 2002). زیست‌توده میکروبی خاک نقش ویژه‌ای در تجزیه مواد آلی، چرخه عناصر و پایداری اکوسیستم دارد و به غلظت آلاینده‌ها در خاک حساس است. با رسیدن آلاینده‌ها به اکوسیستم خاک، ریزجانداران خاک به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌گیرند در حالی که تغییرات قابل توجهی در میزان مواد آلی خاک دیده نمی‌شود، لذا شاخص‌های اکوفیزیولوژیک<sup>۱</sup> جهت بررسی این تغییرات مطرح می‌شوند. افزون بر ارزیابی کمی زیست‌توده میکروبی، بررسی چگونگی حالت فیزیولوژیک جمعیت میکروبی نیز اهمیت زیادی دارد. حالت فیزیولوژیک ریزجانداران خاک بستگی به وضعیت تغذیه‌ای، نوع خاک، آب و هوا و پیامد آلاینده‌ها در خاک دارد. کسر متابولیکی<sup>۲</sup> و کسر میکروبی<sup>۳</sup> از گروه شاخص‌های اکوفیزیولوژیک هستند که برای بررسی وضعیت ریزجانداران خاک به‌کار برده می‌شوند (Shirzadeh *et al.*, 2013). کسر متابولیکی برای ارزیابی پیامد کیفی ویژگی‌ها و تیمارهای گوناگون بر زیست‌توده خاک به‌کار می‌رود. تغییرات این شاخص بستگی به تغییرات ترکیب جمعیتی یا به تغییرات بستره و کربن آلی که یک جمعیت غیرقابل تغییر استفاده می‌کند یا هر دو دارد. برخی گزارش‌ها حاکی از افزایش کسر متابولیکی (Brookes *et al.*, 1986) و برخی دیگر حاکی از کاهش آن دارند (Bååth *et al.*, 1991). این شاخص در خاک‌های آلوده شده با فلزات سنگین بیش‌تر از خاک‌های غیرآلوده گزارش شده است (Chander and Brookes, 1991). هر چه کسر متابولیکی کم‌تر باشد، چرخه‌های میکروبی کارآمدتر هستند. تنش‌هایی مانند کاربرد علف‌کش‌ها سبب افزایش کسر متابولیکی می‌شود. هم‌چنین کسر متابولیکی کارایی مصرف سوسترای بومی خاک توسط جامعه میکروبی را نشان می‌دهد (Anderson and Domsch, 1990) و می‌تواند معرف حساسی برای نشان دادن سمیت فلزات سنگین تحت شرایط طبیعی باشد (Wardle and Ghani, 1995). کسر میکروبی رابطه کربن میکروبی و کربن آلی را نشان می‌دهد و به‌کمک آن می‌توان دینامیک کربن آلی در خاک را بررسی کرد. با این که کربن زیست‌توده ارتباط نزدیکی با مقدار ماده آلی دارد، ولی زیست‌توده از طرفی تحت تأثیر زیست‌فراهمی بستره تجزیه‌پذیر و از طرف دیگر تحت تأثیر محیط شیمیایی و ساختار فیزیکی (نقش حفاظتی) می‌باشد و عواملی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی آن تأثیر بسیار منفی دارند، در حالی که این مواد تأثیر چندانی بر مقدار مواد آلی خاک ندارند. کسر میکروبی با آلوده شدن خاک کاهش می‌یابد (Brookes, 1995).

5 Rutile  
6 Brookite  
7 Metal-based Nanoparticles

1 Ecophysiological indices  
2 Metabolic quotient  
3 Microbial quotient  
4 Anatase

### مواد و روش‌ها

خاک مورد نظر برای انجام این پژوهش به ترتیب از نقطه‌ای با طول عرض جغرافیایی ۳۲/۳ °۲۴' ۴۸° و ۵/۰۸' ۴۱° ۳۶° تهیه شد و پس از گذراندن از الک دو میلی‌متری برخی مشخصات فیزیکوشیمیایی آن از قبیل pH و EC در عصاره اشباع، بافت خاک به روش هیدرومتری (Gee and Bauder, 1986)، درصد کربن آلی به روش والکلی و بلک (Nelson and Sommers, 1982)، درصد

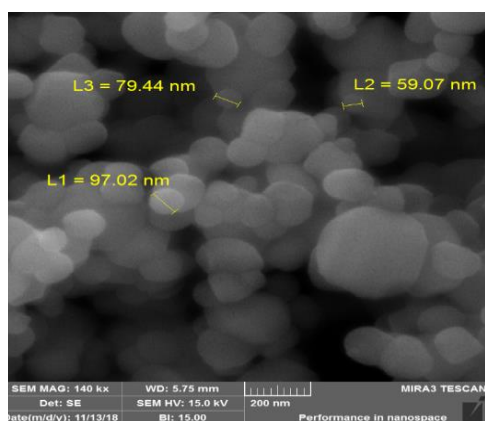
کربنات کلسیم معادل (Loeppert and suarez, 1996)، ظرفیت تبادل کاتیونی به روش باور (Sumner and Miller, 1996)، نیتروژن کل خاک به روش هضم کج‌لدال (Bremner and Mulvaney, 1996)، پتاسیم قابل جذب با استفاده از استات آمونیوم (Hemke and Spark, 1996)، غلظت فسفر قابل جذب به روش اولسن (Olsen, 1954)، غلظت عناصر میکرو نظیر آهن، روی و مس خاک با استفاده از DPTA (Lindsay and Norvell, 1987) تعیین و در جدول (۱) ارائه شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مورد آزمایش

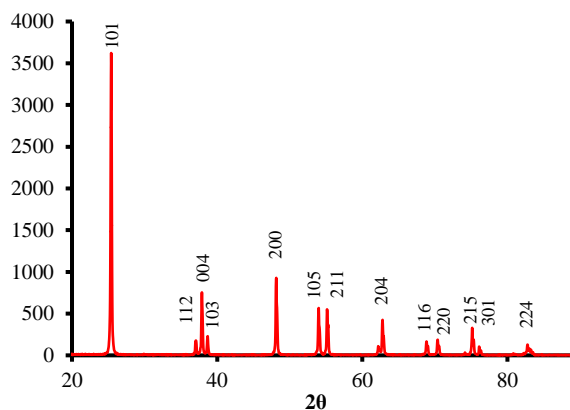
Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Fe (mg/kg)	P <sub>avail</sub>	K <sub>avail</sub>	N <sub>t</sub> (%)	CEC (Cmol/kg)	CCE (%)	OC (%)	EC (mS/m)	pH	بافت خاک
۱/۳۳	۴/۳۹	۳/۱۹	۱۵/۱۲	۲۰۷/۹۲	۰/۰۵۲	۱۳	۲۰/۵۸	۰/۹	۲/۲۵	۷/۸۶	لوم شنی

رفرنس کد<sup>۲</sup> (۱۷۶۴-۰۷۳-۰۱) می‌باشد (شکل ۱). مطابق با شکل (۲) قطر نانوذرات TiO<sub>2</sub> ۷۸ nm می‌باشد.

الگوی پراش اشعه ایکس و تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۱</sup> نانوذره TiO<sub>2</sub> (ساخت کشور آلمان) خریداری شده در شکل‌های (۱ و ۲) ارائه شده است. نانوذرات TiO<sub>2</sub> از نوع آناتاز با



شکل ۲- تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذره TiO<sub>2</sub>



شکل ۱- الگوی پراش پرتو ایکس حاصل از نانوذره TiO<sub>2</sub>

شده و به هم زده شد تا همگن شود (Mansouri and Golchin, 2018). فرایند اسپری شدن نانوذره به خاک آلوده شده با آرسنیک در چندین مرحله تکرار شد تا سطوح صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد وزنی حاصل شود. خاک آلوده شده (۵۰ گرم) به داخل قوطی‌های نمونه ۵۰ ml منتقل و بعد به درون جارهای تنفس L ۱/۳ انتقال داده شدند. برای اندازه‌گیری تنفس پایه<sup>۳</sup>، نمونه‌های خاک موجود در درون جار تنفس در کنار محلول NaOH یک نرمال در دمای ۲۵°C به مدت هشت ماه در اتاقی تاریک انکوباسیون گردید. پس از هفت روز (۱۶۸ ساعت) انکوباسیون، ظروف حاوی سود با HCl

در این پژوهش چهار سطح آلودگی آرسنیک وجود داشت (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg). به منظور آلوده‌سازی خاک با آرسنیک، ۵۰ گرم از خاک الک شده توزین و مقادیر مناسبی از نمک آرسنات سدیم (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) در آب مقطر معادل ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه حل و به خاک توزین شده اسپری گردید و بعد از به هم زدن به منظور همگن شدن، هوا خشک گردید (Mansouri et al., 2016). بعد از هوا خشک شدن خاک آلوده شده، نانوذره TiO<sub>2</sub> در مقادیر مناسبی در آب معادل ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه حل و به این خاک آلوده شده با آرسنیک اسپری

3 Basal Respiration (BR)

1 Scanning Electron Microscope (SEM)  
2 Reference code

تنفس پایه (mgCO<sub>2</sub>-C/g) و MBC؛ کربن زیست توده میکروبی (mgCO<sub>2</sub>-C/g) است (Moscatelli et al., 2005).

برای محاسبه درصد تنفس تجمعی به این صورت عمل شد که ابتدا تنفس پایه (mgCO<sub>2</sub>-C/g soil.day) برای هر قرائت (اندازه گیری میزان CO<sub>2</sub> حاصل از تنفس از طریق تیتراسیون) محاسبه شد و بعد مجموع تنفس در طول هشت ماه انکوباسیون از روی قرائت‌هایی که در طول هفت روز انجام می‌شد، به دست آمد. با تقسیم میزان تنفس در هر قرائت (هفت روز انکوباسیون) بر مجموع تنفس در طول هشت ماه انکوباسیون و ضرب عدد به دست آمده در ۱۰۰، درصد تنفس برای هر قرائت حاصل شد  $(100 \times \frac{\text{میزان تنفس در هر قرائت}}{\text{مجموع تنفس}})$  و در نهایت با حاصل جمع درصد

تنفس قرائت معین با قرائت‌های ما قبل آن، درصد تنفس تجمعی برای آن قرائت معین حاصل شد (Rezaie and Raiesi, 2016). آزمایش مورد نظر به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار به اجرا درآمد. آلاینده آرسنیک در چهار سطح (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg) و نانوذره TiO<sub>2</sub> در سه سطح (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد وزنی) فاکتورهای این آزمایش را تشکیل می‌دادند.

برای انجام آنالیز واریانس داده‌ها از تجزیه واریانس دو طرفه استفاده شد. اثرات متقابل بین فاکتورها و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم افزار SPSS نسخه (۲۲) صورت پذیرفت و ترسیم نمودارها نیز با کمک نرم افزار Excel انجام شد.

## نتایج و بحث

### تغییرات درصد تنفس تجمعی ریزجانداران

نوسانات درصد تنفس تجمعی در طول هشت ماه در شکل‌های (A-۳) تا (I-۳) نشان داده شده است. شکل (A-۳) نشان داد که نمودار درصد تنفس تجمعی مربوط به تیمار شاهد و تیمار ۲۵ آرسنیک برهم منطبق نیستند. وقتی که به همین غلظت از آرسنیک، ۰/۲۵ درصد وزنی نانوذره اضافه شد، میزان تنفس نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (شکل B-۳)، ولی با افزایش سطح نانوذره در شکل (C-۳) به ۰/۵ درصد وزنی، نوسانات مشاهده شده در شکل (A-۳ و B) تا حدودی برطرف گردید.

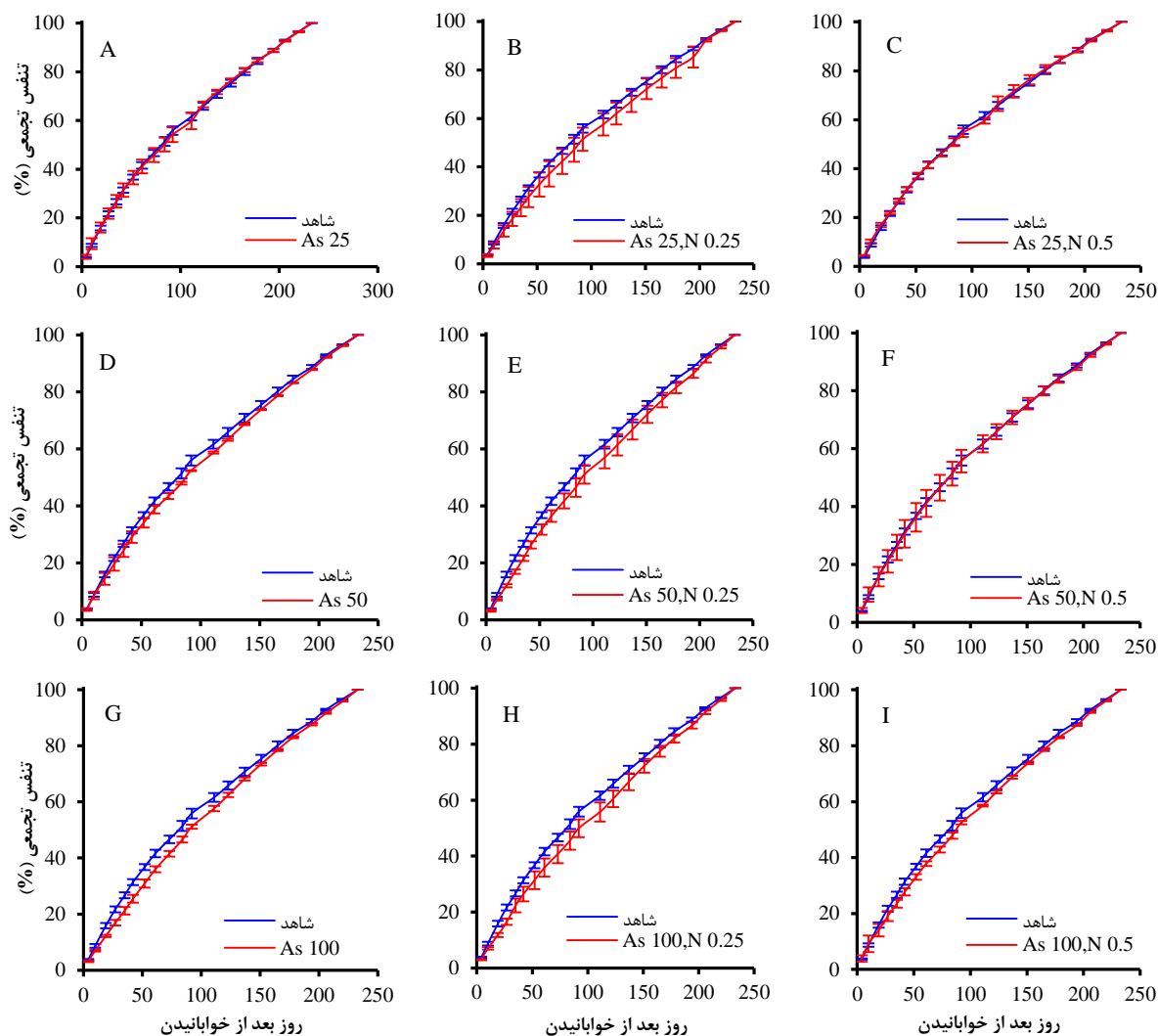
۰/۱ نرمال تیترا شد (Isermeyer, 1952) و این کار به مدت هشت ماه به طول انجامید. میزان CO<sub>2</sub> باقیمانده پس از هفت روز انکوباسیون نشان دهنده عدم اشباع سود با CO<sub>2</sub> بود. برای اطمینان از اکسیژن کافی در هوای داخل جار بعد از هفت روز انکوباسیون، میزان اکسیژن هوای داخل جار با اکسیژن متر مدل LUTRON PO2-250 اندازه گیری شد تا از عدم محدودیت اکسیژن برای فعالیت‌های ریزجانداران اطمینان حاصل شود. پس از پایان دوره انکوباسیون، مقدار تنفس پایه بر حسب میلی گرم کربن در گرم خاک در ماه (mgCO<sub>2</sub>-C/g soil.month) برآورد شد. برای اندازه گیری کربن زیست توده میکروبی<sup>۱</sup> از روش گازدهی با کلروفرم-انکوباسیون استفاده شد. به این صورت که کربن زیست توده میکروبی از اختلاف بین کربن معدنی خاک در نمونه‌های گازدهی نشده و گازدهی شده طی ۱۴ روز انکوباسیون به دست آمد. بعد از هشت ماه اندازه گیری تنفس پایه، خاک مورد آزمایش گازدهی شده و اقدام به اندازه گیری کربن زیست توده گردید، لذا کربن زیست توده به دست آمده، نشانگر کربن زیست توده ریزجانداران مقاوم به آرسنیک محسوب می‌شود. اختلاف بین کربن متصاعد شده به صورت CO<sub>2</sub> از نمونه‌های گازدهی شده و گازدهی نشده به عنوان کربن زیست توده با استفاده از رابطه (۱) تعیین گردید. کسر میکروبی (qmic) از تقسیم کربن زیست توده میکروبی بر کربن آلی (OC) خاک طبق رابطه (۲) به دست آمد (Moscatelli et al., 2005).

$$MBC = \frac{(F_C - uF_C)}{k_C} \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$qmic = \frac{MBC}{OC} \quad \text{رابطه (۲)}$$

$$qCO_2 = \frac{BR}{MBC} \quad \text{رابطه (۳)}$$

MBC؛ کربن زیست توده میکروبی (mgCO<sub>2</sub>-C/g)، F<sub>C</sub> کربن معدنی شده یا CO<sub>2</sub> متصاعد شده در نمونه‌های گازدهی شده با کلروفرم (mgCO<sub>2</sub>-C/g)، uF<sub>C</sub> کربن معدنی شده یا CO<sub>2</sub> متصاعد شده در نمونه‌های گازدهی نشده (mgCO<sub>2</sub>-C/g) و K<sub>C</sub> ضریب بازیافت که معادل ۰/۴۵ است (Jenkinson, 1981). برای محاسبه کسر متابولیکی (qCO<sub>2</sub>) از میزان تنفس پایه یا متوسط کربن متصاعد شده از خاک گازدهی نشده طی ۱۴ روز و کربن زیست توده میکروبی (MBC) بر طبق رابطه (۳) استفاده شد. در رابطه (۳) qCO<sub>2</sub>؛ کسر متابولیکی (mgCO<sub>2</sub>-C/mg MBC) و BR؛



شکل ۳- میزان کربن آزاد شده به صورت CO<sub>2</sub> (%) از خاک تیمار شده در مدت زمان هشت ماه

به ۰/۵ درصد وزنی، به دلیل جذب بیشتر آلاینده‌ها به سطح نانوذره و عدم اشباع سطح نانوذره با آلاینده، از کاهش میزان تنفس ممانعت به عمل آمد، ولی در شکل (۳-۱)، نسبت به شکل‌های (۳-۲) و (۳-۳) نوسانات درصد تنفس تجمعی بیشتر بود، این امر نشان داد که با افزایش سطح آلاینده‌ها به ۱۰۰ mg/kg آرسنیک، حتی ۰/۵ درصد وزنی نانوذره هم نمی‌تواند همه آلاینده‌ها را جذب و از تأثیر مخرب آن بر جامعه ریزجانداران جلوگیری کند. Dai *et al.* (2004) نشان دادند که در خاک‌های آلوده به عناصر سنگین مانند کادمیم، میزان کربن معدنی شده با افزایش غلظت فلز کاهش یافت. اگر چه سرعت تولید CO<sub>2</sub> در خلال روزهای اول افزایش یافت، ولی پس از آن کاهش معنی‌داری داشت. با ترسیم منحنی درصد تنفس تجمعی می‌توان از روی شیب این منحنی‌ها به شدت تنفس ریزجانداران پی برد، موقعی که منحنی به صورت نمایی افزایش می‌یابد نشان دهنده افزایش تنفس ریزجانداران است و موقعی که شدت تنفس کم شده و

نوسانات درصد تنفس تجمعی با افزایش سطوح آلودگی به ۵۰ mg/kg آرسنیک نیز مشابه با ۲۵ mg/kg آرسنیک بود. بدین صورت که نوسانات در تیمار ۵۰ mg/kg آرسنیک با ۰/۲۵ درصد وزنی نانوذره نسبت به تیمار شاهد (شکل ۳-۲) در مقایسه با شکل‌های (۳-۲) و (۳-۳) بیش‌تر بود و کم‌ترین نوسان در تیمار ۵۰ mg/kg آرسنیک به همراه ۰/۵ درصد وزنی نانوذره مشاهده گردید (شکل ۳-۳). همین روال برای تیمار ۱۰۰ mg/kg آرسنیک نیز تکرار شد، ولی با این تفاوت که نوسانات درصد تنفس تجمعی در تیمار ۱۰۰ mg/kg آرسنیک به همراه ۰/۵ درصد وزنی نانوذره نیز نسبت به سایر تیمارهایی که با همین درصد وزنی از نانوذره تیمار شده بودند، بیش‌تر بود (شکل ۳-۱). افزایش نوسانات در تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg آرسنیک با ۰/۲۵ درصد وزنی نانوذره، می‌تواند به دلیل اشباع شدن سطح نانوذره با آلاینده آرسنیک در همه سطوح یاد شده آرسنیک باشد، ولی با افزایش سطح نانوذره TiO<sub>2</sub> در همه سطوح آلاینده‌ها از ۰/۲۵ درصد وزنی

تنفس مجدداً کاهش یافت تا این که در ماه هشتم میزان تفاوت تنفس در بین کلیه تیمارها غیرمعنی دار شد (شکل ۴). دلیل کاهش میزان تنفس در ماه‌های هفتم و هشتم می‌تواند محدودیت ناشی از میزان کربن آلی موجود در خاک باشد. پروکاریوت‌ها نسبت به یوکاریوت‌ها سرعت تکثیر بیش‌تری دارند و در عین حال به فلزات سنگین حساس‌تر می‌باشند، تحت تأثیر فلزات سنگین قسمت عمده‌ای از پروکاریوت‌ها از بین رفته و یوکاریوت‌ها در ساختار میکروفلور خاک، جمعیت غالب را تشکیل می‌دهند، بنابراین کاهش در میزان تنفس و تولید CO<sub>2</sub> در خاک آلوده می‌تواند به علت کاهش در جمعیت پروکاریوت‌ها باشد (Yazdan Panah *et al.*, 2008). محققین مختلف یکی از عوامل تأثیرگذار بر میزان تنفس را دسترسی به کربن آلی خاک دانسته‌اند (Ding *et al.*, 2007; Fang and Moncrieff, 2005). بیش‌ترین و کم‌ترین میزان تنفس به ترتیب در ماه‌های اول و هشتم انکوباسیون از تیمارهای شاهد و ۲۵ mg/kg آرسنیک با اختلاف ۳۳/۷۸ درصد حاصل شد. اضافه کردن عناصر سمی به خاک سبب از بین رفتن بخش زیادی از میکروبی‌های خاک می‌شود و در نتیجه باعث افزایش تنفس ناشی از تجزیه سلول‌های میکروبی کشته شده توسط ریزجانداران باقیمانده می‌شود (Landi *et al.*, 2000). تنفس پایه و تجمعی نشان‌دهنده فعالیت متابولیکی زیست‌توده میکروبی تجزیه‌کننده مواد آلی است (Ghosh *et al.*, 2004).

اثر متقابل زمان و سطوح مختلف نانوذره بر میزان تنفس ماهیانه در شکل (۵) ارائه شده است. با افزایش سطوح نانوذره از ۰/۲۵ تا ۰/۵ درصد وزنی تا ماه چهارم انکوباسیون میزان تنفس ماهیانه نیز افزایش یافت و در این مدت زمان (چهار ماه)، بیش‌ترین میزان تنفس نیز از تیمار ۰/۵ درصد وزنی نانوذره حاصل شد. از ماه پنجم انکوباسیون به بعد میزان تنفس کاهش یافت و در ماه هشتم انکوباسیون تفاوت میزان تنفس بین سطوح مختلف نانوذره غیرمعنی‌دار بود. بیش‌ترین میزان تنفس در ماه اول از ۰/۵ درصد وزنی نانوذره و کم‌ترین آن نیز از صفر درصد نانوذره در ماه هشتم انکوباسیون با اختلاف ۲۶/۸۹ درصد حاصل شد. Khadem Moghadam Igdellou and Golchin (2018) گزارش کردند که نانوذرات TiO<sub>2</sub> جزو بهترین جاذب‌های شناخته شده برای شبه فلز آرسنیک هستند. Ge *et al.* (2011) در بررسی اثر نانوذرات ZnO و TiO<sub>2</sub> بر ریزجانداران خاک گزارش کردند که خود نانوذرات اثرات منفی بر جامعه ریزجانداران دارند، آنان اثرات منفی نانوذره ZnO را بیش‌تر از TiO<sub>2</sub> بر تنفس و ترکیب جامعه ریزجانداران عنوان کردند. Shrestha *et al.* (2013) در ارزیابی اثر

به‌صورت تقریباً خطی است نشان دهنده سازگاری ریزجانداران با محیط است که این حالت بیش‌تر در تصمیم‌گیری جهت تمام اندازه‌گیری تنفس خاک به‌ویژه در اندازه‌گیری تنفس برانگیخته خاک کارساز است.

#### تأثیر زمان بر میزان تنفس پایه

با اضافه شدن فاکتور زمان به فاکتورهای سطوح آرسنیک و نانوذره، اطلاعات مفیدی حاصل شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل زمان و سطوح آرسنیک ( $p \leq 0.01$ ) و هم چنین اثر متقابل زمان و سطوح نانوذره معنی‌دار بود ( $p \leq 0.05$ ), ولی اثر متقابل زمان، سطوح نانوذره و آرسنیک بر میزان تنفس معنی‌دار نبود (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف آرسنیک و نانوذره TiO<sub>2</sub> بر مقدار تنفس پایه ریزجانداران در طول هشت ماه

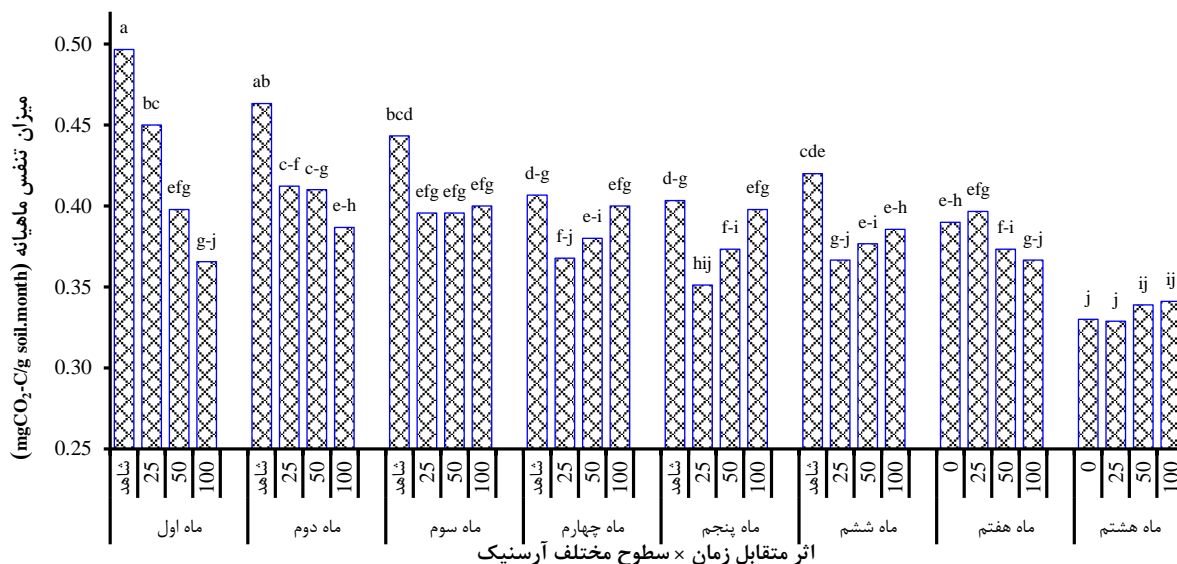
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات تنفس پایه
زمان (T)	۷	۰/۰۳**
سطوح آرسنیک (As)	۳	۰/۰۲۶**
سطوح نانوذره TiO <sub>2</sub>	۲	۰/۰۰۱ <sup>ns</sup>
T×As	۲۱	۰/۰۰۵**
T×TiO <sub>2</sub>	۱۴	۰/۰۰۳*
TiO <sub>2</sub> ×As	۶	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>
T×TiO <sub>2</sub> ×As	۴۲	۰/۰۰۱ <sup>ns</sup>
خطا	۱۹۲	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات (C.V)	-	۱۳/۲۹

\*, \*\* و <sup>ns</sup> به ترتیب نشان دهنده تفاوت آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار است.

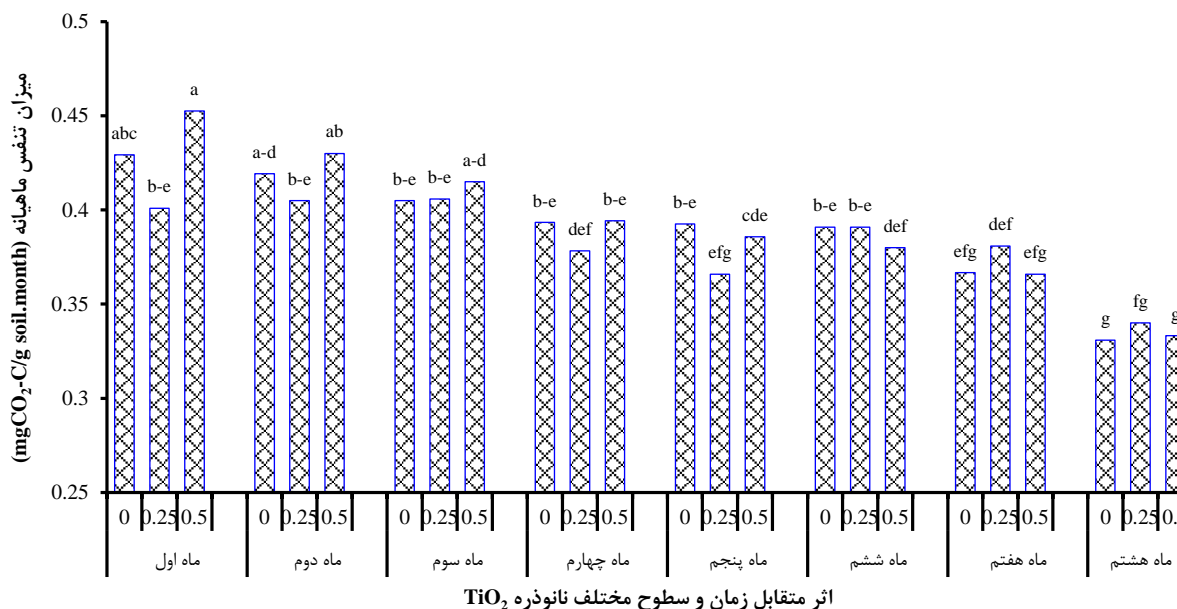
اثر متقابل زمان و سطوح مختلف آرسنیک بر تنفس میکروبی در طول هشت ماه در شکل (۴) ارائه شده است. مطابق با شکل (۴) با افزایش سطوح آلایندگی از تیمار شاهد تا ۱۰۰ mg/kg آرسنیک در طول ماه‌های اول و دوم میزان تنفس کاهش معنی‌داری یافت، در ماه سوم اثر سطوح مختلف آرسنیک بر میزان تنفس معنی‌دار نبود (از روی میزان تنفس می‌توان گفت که در سه ماهه اول انکوباسیون کربن آلی خاک کاهش چندانی نداشت)، ولی در ماه‌های چهارم، پنجم و ششم انکوباسیون، با افزایش سطوح آرسنیک از ۲۵ به ۱۰۰ mg/kg بر میزان تنفس افزوده شد. به‌نظر می‌رسد مدت زمانی که طول می‌کشد تا ریزجانداران خود را با شرایط محیط آلوده به آرسنیک وفق دهند، سه ماه طول کشیده و بعد از این مدت زمان با فعال شدن ریزجانداران و با در اختیار داشتن کربن آلی خاک و لاشه ریزجانداران حساس از بین رفته، میزان تنفس افزایش می‌یابد. در ماه هفتم انکوباسیون میزان

نانوتیوب‌ها (۱۰۰۰۰ mg/kg) ترکیب اجتماع میکروبی را تغییر داد و در نهایت اجتماع میکروبی مقاومی نسبت به این نانوتیوب‌ها تشکیل شد.

نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره<sup>۱</sup> (MWCNTs) بر ساختار اجتماع میکروبی عنوان کردند که غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و mg/kg MWCNT ۱۰۰۰ اثری بر تنفس خاک، فعالیت آنزیم‌های خاک و ساختار اجتماع میکروبی نداشت، ولی در غلظت بسیار بالا



شکل ۴- تأثیر زمان و سطوح مختلف آرسنیک بر میزان تنفس ریزجانداران در طول مدت انکوباسیون به تفکیک ماه‌ها. حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۵- تأثیر زمان و سطوح مختلف نانوذره TiO<sub>2</sub> بر میانگین تنفس پایه ریزجانداران به تفکیک ماه در طول مدت انکوباسیون. حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

اکوفیز یولوژیکی در جدول (۳) ارائه شده است. اثر متقابل آرسنیک و نانوذره بر کربن زیست‌توده میکروبی ( $p \leq 0.05$ )، کسر متابولیکی ( $p \leq 0.05$ ) و کسر میکروبی معنی‌دار شد ( $p \leq 0.01$ ) (جدول ۳).

کربن زیست‌توده میکروبی و شاخص‌های اکوفیز یولوژیکی نتایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف آرسنیک، نانوذره و برهم کنش‌های آن‌ها بر کربن زیست‌توده میکروبی و شاخص‌های



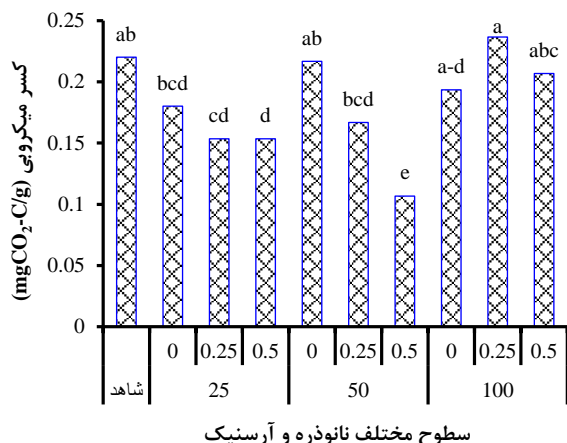
جدول ۳- تایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف آرسنیک و نانوذره  $TiO_2$  بر میزان کربن زیست توده میکروبی، کسر متابولیکی و کسر میکروبی

میانگین مربعات		کربن زیست توده میکروبی	درجه آزادی	منابع تغییرات
شاخص های اکوفیزیولوژیکی	کسر میکروبی			
کسر میکروبی	کسر متابولیکی			
۰/۰۰۹**	۱/۷۷۵*	۰/۰۰۷**	۳	سطوح آرسنیک (As)
۰/۰۰۳*	۱/۸۱۵*	۰/۰۰۳*	۲	سطوح نانوذره $TiO_2$
۰/۰۰۳**	۱/۲۲۶*	۰/۰۰۲*	۶	$TiO_2 \times As$
۰/۰۰۱	۰/۴۰۴	۰/۰۰۱	۲۴	خطا
۱۱/۴۸	۱۷/۵۰	۱۱/۵۰	-	ضریب تغییرات (C.V)

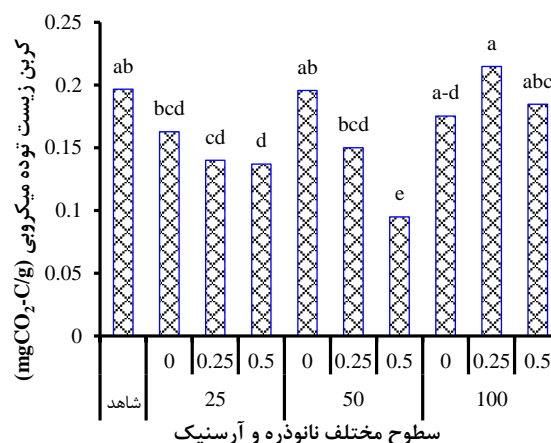
\*\*، \* و ns به ترتیب نشان دهنده تفاوت آماری معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم تفاوت معنی دار است.

ریزجانداران در شرایط تنش به ازای هر واحد سوبسترای آلی اضافه شده، کربن کمتری را صرف تشکیل زیست توده جدید برای رشد می کنند. از این رو، چنین می توان گفت که در خاک های آلوده کارایی متابولیکی در تبدیل سوبسترای آلی به زیست توده کاهش می یابد و فقط کربن برای تولید انرژی مصرف می گردد (Dayani and Raiesi, 2011) و بعد از مقاوم شدن ریزجانداران به شرایط محیطی، وضعیت برعکس می شود. نسبت کربن زیست توده میکروبی به کربن آلی خاک (کسر میکروبی) الگوی بسیار مشابهی با کربن زیست توده میکروبی نشان داد (شکل ۷). از آنجایی که نمونه های خاک بررسی شده کاملاً یکسان بودند و اندازه کربن آلی کل خاک در همه تیمارها یکسان بود، بنابراین کربن زیست توده میکروبی تنها منبع تغییر کسر میکروبی بود و تغییرات کسر میکروبی کاملاً منطبق بر تغییرات کربن زیست توده میکروبی است. Shirzadeh et al. (2013) در بررسی تأثیر آلودگی سرب بر تنفس میکروبی و شاخص های اکوفیزیولوژیک، نتایج مشابهی را گزارش کردند. کربن زیست توده میکروبی به منظور ارزیابی عکس العمل میکروبی خاک به مدیریت، تغییرات زیست محیطی، به هم خوردگی زیستگاه و جمعیت خاک اندازه گیری می گردد (Karimian-Shamsabadi et al., 2016). Edvantoro et al. (2003) طی تحقیقی روی آلودگی آرسنیک و DDT بر جامعه میکروبی خاک، عنوان کردند که کاهش معنی دار کربن زیست توده میکروبی خاک به دلیل کمبود مواد غذایی مورد نیاز ریزجانداران یا ناشی از pH نامناسب خاک نبوده بلکه به علت سمیت ناشی از آرسنیک و DDT رخ داده است. Duker et al. (2005) گزارش کردند که ریزجانداران خاصی می توانند نسبت به سمیت آرسنیک سازگار شوند و تعداد زیادی از ریزجانداران می توانند در محیط های غنی از آرسنیک رشد کنند.

اثر متقابل سطوح مختلف آرسنیک و نانوذره بر میزان کربن زیست توده میکروبی در شکل (۵) ارائه شده است. بیشترین کربن زیست توده میکروبی در تیمار ۱۰۰ mg/kg آرسنیک همراه با ۰/۲۵ درصد وزنی نانوذره و کمترین آن در تیمار ۵۰ mg/kg آرسنیک همراه با ۰/۵ درصد وزنی نانوذره و با اختلاف معنی داری برابر با ۵۵/۷۵ درصد مشاهده شد. مطابقت نمودار درصد تنفس جمعیتی تیمار شاهد با تیمار ۵۰ mg/kg آرسنیک به همراه ۰/۵ درصد وزنی نانوذره (شکل ۳-F)، به مفهوم جذب بیشترین مقدار آرسنیک در تیمار مذکور است، لذا سمیت آن به کمترین حد رسیده به طوری که رفتاری مثل تیمار شاهد از خود نشان داد. از این رو، بعد از حدود چند ماه از انکوباسیون بیشترین قسمت مواد آلی موجود در خاک معدنی شده و به دلیل محدودیت کربن آلی جمعیت ریزجانداران کاهش یافته و بعد از هشت ماه جمعیت ریزجانداران به کمترین مقدار خود رسید. وقتی در انتهای دوره انکوباسیون کربن زیست توده ریزجانداران مقاوم اندازه گیری شد، کمترین کربن زیست توده نیز از همین تیمار حاصل شد (شکل ۶). در تیمار ۱۰۰ mg/kg آرسنیک همراه با ۰/۲۵ درصد وزنی نانوذره، نسبت به سایر سطوح آلودگی و نانوذره، بیشترین کاهش در درصد تنفس جمعیتی مطابق با شکل (شکل ۳-E) دیده شد و کاهش تنفس به مفهوم سمیت آرسنیک برای ریزجانداران است، از این رو، تنفس میکروبی کم تر بود و بعد از چند ماه ریزجانداران با شرایط تنش سازگار شده و با در اختیار داشتن کربن آلی خاک، کربن زیست توده بیش تری تولید کردند (با افزایش سطوح آلودگی میزان تنفس به طور معنی داری کاهش یافت، بنابراین می توان اظهار داشت که میزان تجزیه کربن آلی در خاک با افزایش سطوح آلودگی نیز به شدت کم شد (شکل ۴)). حد سمیت آرسنیک در خاک ۲۰ mg/kg عنوان شده است (Liao et al., 2005).



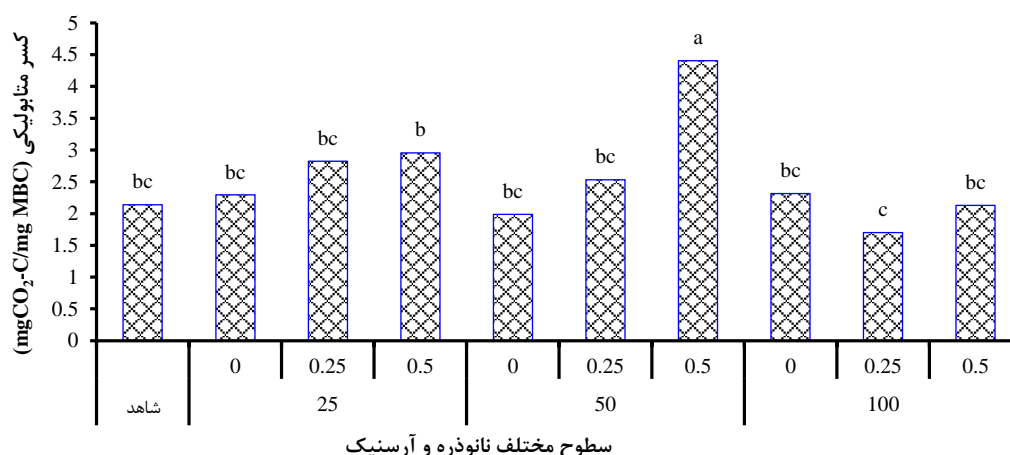
شکل ۷- اثر متقابل سطوح مختلف آرسنیک و نانوذره TiO<sub>2</sub> بر میزان کسر میکروبی. حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار است.



شکل ۶- اثر متقابل سطوح مختلف آرسنیک و نانوذره TiO<sub>2</sub> بر میزان کربن زیست توده میکروبی. حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار است.

داشتند (شکل ۸). Prasad *et al.* (2013) در بررسی عملکرد ریزجانداران در سه نوع خاک انتی سل، انسپتی سل و ورتی سل آلوده شده به آرسنیک گزارش کردند که با افزایش سطوح آلودگی خاک در هر سه نوع خاک، کلیه پارامترهای تنفس و شاخص های اکوفیزیولوژیکی کاهش یافتند، بیشترین تنفس پایه و کربن زیست توده میکروبی در خاک ورتی سل به دست آمد، ولی در همین خاک کسر متابولیکی کم تر بود. افزایش سریع کسر متابولیکی نشان دهنده ناکارآمدی جامعه میکروبی در تحمل شرایط تنش زای محیطی و تأثیر عوامل تنش مثل تنش فلزات سنگین بر ریزجانداران است (Marabottini *et al.*, 2013).

مطابق با شکل (۶)، کمترین کربن زیست توده میکروبی از تیمار ۵۰ mg/kg آرسنیک همراه با ۰/۵ درصد وزنی نانوذره به دست آمد، با کاهش کربن زیست توده میکروبی، میزان شاخص اکوفیزیولوژیکی کسر متابولیکی افزایش می یابد، به همین دلیل است که با بررسی اثرات متقابل سطوح آرسنیک و نانوذره، بیشترین مقدار کسر متابولیکی نیز از تیمار ۰/۵ درصد وزنی نانوذره به همراه ۵۰ mg/kg آرسنیک حاصل شد و کمترین میزان کسر متابولیکی نیز در تیمار ۱۰۰ mg/kg آرسنیک به همراه ۰/۲۵ درصد وزنی نانوذره TiO<sub>2</sub> به دست آمد (شکل ۸). بیشترین و کمترین میزان کسر متابولیکی اختلافی برابر با ۶۲/۱۰ درصد



شکل ۸- اثر متقابل سطوح مختلف آرسنیک و نانوذره TiO<sub>2</sub> بر میزان کسر متابولیکی. حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار است.

عنوان کردند که تنفس پایه، تنفس تجمعی و کسر متابولیکی در خاکی با آلودگی متوسط آرسنیک کم تر از خاک هایی با آلودگی

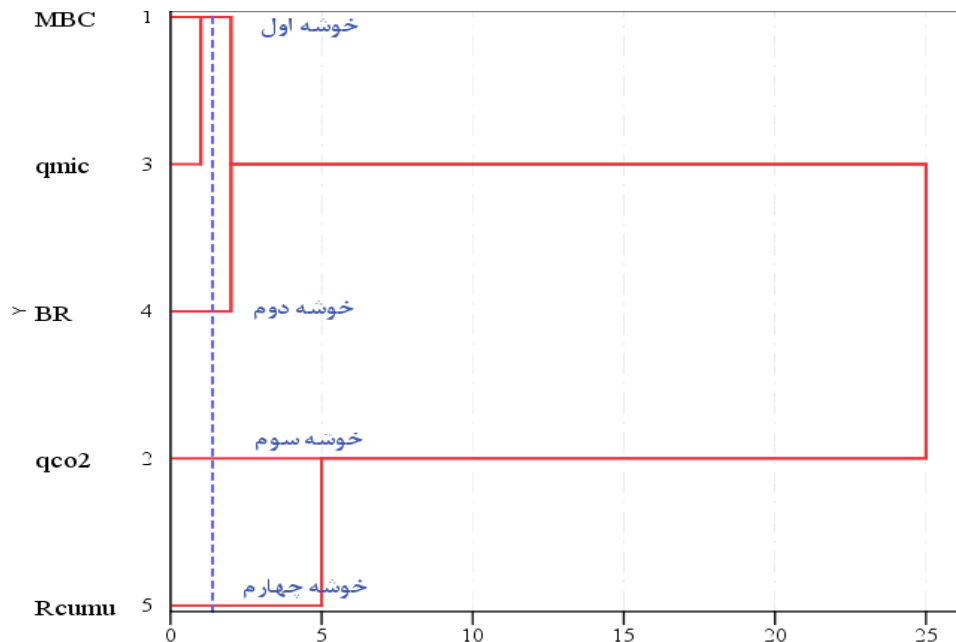
توزیع آرسنیک در خاک معادن و اثرات آن بر جامعه میکروبی

شکل‌های (۶ و ۷) ذکر گردید، کربن زیست‌توده میکروبی و کسر میکروبی نوسانات مشابهی داشتند که به دلیل یکسانی خاک مورد استفاده و داشتن کربن آلی یکسان بود، که با نتایج حاصل از تحلیل خوشه‌ای سلسله مراتبی مطابقت داشت. با فاصله کم‌تر از خوشه اول، خوشه دوم یعنی تنفس پایه قرار گرفت، بنابراین تنفس پایه تا حدودی شبیه به کربن زیست‌توده میکروبی و کسر میکروبی عمل کرده است. کسر متابولیکی هم در خوشه سوم قرار گرفته است. تنفس تجمعی هم در آخرین خوشه، خوشه چهارم قرار گرفته است. با توجه به نتایج حاصل از تحلیل سلسله مراتبی، انتظار بر این است که پاسخ‌های کربن زیست‌توده میکروبی و کسر میکروبی به سطوح مختلف آرسنیک و نانوذره مشابه هم باشد و تنفس پایه هم تا حدودی تابع روند این دو شاخص باشد.

کم و زیاد بود، ولی میزان کسر میکروبی در خاکی با آلودگی متوسط زیادتر از دیگر خاک‌ها به دست آمد.

#### تحلیل خوشه‌ای سلسله مراتبی

برای طبقه‌بندی پاسخ‌های متفاوت متغیرهای وابسته، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای سلسله مراتبی<sup>۱</sup> جهت شناسایی گروه‌های نسبتاً همگن استفاده شد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای سلسله مراتبی با استفاده از روش وارد<sup>۲</sup> اجرا گردید و فاصله اقلیدسی به عنوان معیاری برای تشکیل خوشه‌ها در نظر گرفته شد. مطابق با شکل (۹)، متغیرهای وابسته مورد ارزیابی در این پژوهش به چهار خوشه تقسیم شدند که متغیرهای کربن زیست‌توده میکروبی و کسر میکروبی هر دو در یک خوشه قرار گرفتند. همان گونه که در



شکل ۹- دندروگرام حاصل از خوشه‌بندی به روش وارد برای شاخص‌های اکوفیزیولوژیکی، تنفس پایه و کربن زیست‌توده میکروبی خط چین آبی رنگ در شکل، نشان دهنده محل تعیین خوشه‌هاست. Rcumu در شکل نشان‌دهنده تنفس تجمعی است.

زیست‌توده فعال و کسر میکروبی در آنالیز خوشه‌ای سلسله مراتبی در یک گروه گرفته و پاسخ مشابهی به سمیت آرسنیک از خود نشان دادند.

#### نتیجه‌گیری

با افزایش آلودگی خاک به فلزات سنگین در دهه گذشته بسیاری از پژوهشگران نگاه ویژه‌ای به کاربرد نانوذرات در خاک دارند. با

Yang et al. (2006) گزارش کردند که شاخص‌های کربن

زیست‌توده میکروبی و تنفس میکروبی می‌توانند به عنوان شاخص‌های مفیدی در ارزیابی آلودگی خاک با فلزات سنگینی چون سرب، روی، مس و نیکل باشند. Prasad et al. (2013) طی ارزیابی زیست‌توده میکروبی و فعالیت آن‌ها در خاک‌هایی با غلظت‌های متفاوت آرسنیک، عنوان کردند که آزمون‌های خاک (دهیدروناز و فلوروسن دی‌استات هیدرولاز<sup>۳</sup>)، تنفس فعال، کربن

1 Hierarchical cluster analysis  
2 Ward's method  
3 fluorescein diacetate hydrolase

نانوذره  $TiO_2$  به کاربرده شده در این مطالعه، سطح ۰/۵ درصد وزنی نانوذره  $TiO_2$  بیشترین تأثیر مثبت را بر جامعه ریزجانداران داشت. بیشترین کربن زیست‌توده میکروبی و کسر میکروبی از تیمار  $100 \text{ mg/kg}$  و ۰/۲۵ درصد وزنی نانوذره حاصل شد و بیشترین کسر متابولیسی نیز از  $50 \text{ mg/kg}$  آرسنیک و ۰/۵ درصد وزنی نانوذره  $TiO_2$  به دست آمد، تحلیل خوشه‌ای نیز نشان از همگن بودن پاسخ‌های کربن زیست‌توده میکروبی و کسر میکروبی داشت.

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

## REFERENCES

- Anderson, T. H. and Domsch, K. H. (1990). Application of eco-physiological quotients ( $qCO_2$  and  $qD$ ) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(2), 251-255.
- Ansari, M. I. and Malik, A. (2007). Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 98(16), 3149-3153.
- Aryabod, S., Fotovat, A., Khorasani, R. and Entezari, M. (2017). Cadmium adsorption on  $TiO_2$  Nanoparticles in soil suspensions. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 48(2), 349-358. (In Farsi)
- Austin, A. T., Yahdjian, L., Stark, J. M., Belnap, J., Porporato, A., Norton, U., Ravetta, D. A. and Schaeffer, S. M. (2004). Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*, 141(2), 221-235.
- Bååth, E., Arnebrant, K. and Nordgren, A. (1991). Microbial biomass and ATP in smelter-polluted forest humus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2), 278-282.
- Bremner, J. M. and Mulvaney, C. S. (1996). Kjeldhal Method. Method of Soil Analysis Part-2: Chemical & Microbiological Properties, *American Society of Agronomy, Madison*, 903-948.
- Brookes, P. C. (1995). The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, 19(4), 269-279.
- Brookes, P. C., Heijnen, C. E., McGrath, S. P. and Vance, E. D. (1986). Soil microbial biomass estimates in soils contaminated with metals. *Soil Biology and Biochemistry*, 18(4), 383-388.
- Chander, K. and Brookes, P. C. (1991). Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam UK soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(10), 927-932.
- Dai, J., Becquer, T., Rouiller, J. H., Reversat, G., Bernhard-Reversat, F. and Lavelle, P. (2004). Influence of heavy metals on C and N mineralisation and microbial biomass in Zn-, Pb-, Cu-, and Cd-contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 25(2), 99-109.
- Dayani, L. and Raiesi, F. (2011). The role of compost in alleviating cadmium effects on microbial respiration and biomass, and phosphatase activity in soil. *Journal of Water and Soil*, 25(1), 161-173. (In Farsi)
- Ding, W., Meng, L., Yin, Y., Cai, Z. and Zheng, X. (2007).  $CO_2$  emission in an intensively cultivated loam as affected by long-term application of organic manure and nitrogen fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 669-679.
- Duker, A. A., Carranza, E. and Hale, M. (2005). Arsenic geochemistry and health. *Environment international*, 31(5), 631-641.
- Edvantoro, B. B., Naidu, R., Megharaj, M. and Singleton, I. (2003). Changes in microbial properties associated with long-term arsenic and DDT contaminated soils at disused cattle dip sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), 344-351.
- Fang, C. and Moncrieff, J. B. (2005). The variation of soil microbial respiration with depth in relation to soil carbon composition. *Plant and Soil*, 268(1), 243-253.
- Filip, Z. (2002). International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88(2), 169-174.
- Frostegård, Å. and Bååth, E. (1996). The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 22(1-2), 59-65.
- Ge, Y., Schimel, J. P. and Holden, P. A. (2011). Evidence for negative effects of  $TiO_2$  and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environmental Science & Technology*, 45(4), 1659-1664.
- Gee, G. W. and Bauder, J. W. (1986). Physical and mineralogical methods. In: Klute, A. (Ed.), *Methods of soil analysis, Part 1. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA*, pp. 383-411.
- Ghosh, A. K., Bhattacharyya, P. and Pal, R. (2004). Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India. *Environment International*, 30(4), 491-499.
- Hemke, P. H. and Spark, D. L. (1996). Potassium. In:

- Method of soil analysis. Sparks, DL, *Soil Science Society of America, Inc. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA*, 551-574.
- Isermeyer, H. (1952). Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*, 56(1-3), 26-38.
- Jenkinson, D. S. (1981). Microbial biomass in soil: measurement and turnover. *Soil Biochemistry*, 5, 415-471.
- Karimian-Shamsabadi, N., Ghorbani Dashtaki, Sh. and Raiesi, F. (2016). The effect of urban sewage sludge on chemical properties, soil basal respiration and microbial biomass carbon in a calcareous silty clay loam soil. *Journal of Water and Soil Science*, 21(1), 255-264. (In Farsi)
- Khadem Moghadam Igdellou, N., Hatami, M., Rezaei, S., Bayat, M. and Lajayer, B. A. (2019). Induction of plant defense machinery against nanomaterials exposure. In M. Ghorbanpour and H. W. Shabir (Ed.), *Advances in Phytonanotechnology*. (pp. 241-263). Academic Press.
- Khadem Moghadam Igdellou, N. and Golchin, A. (2018). The effect of titanium dioxide nanoparticles on soil heavy metals and plant yield. In: *Proceedings of the first International Conference on Society and Environment*, 11 Sept., Tehran University, Tehran, Iran. (In Farsi)
- Khadem Moghadam Igdellou, N. and Golchin, A. (2019). Risk assessment of contamination of the country's soil and water resources with arsenic. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 50(7), 1595-1617. (In Farsi)
- Landi, L., Renella, G., Moreno, J. L., Falchini, L. and Nannipieri, P. (2000). Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-: D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 32(1), 8-16.
- Lata, S. and Samadder, S. R. (2016). Removal of arsenic from water using nano adsorbents and challenges: a review. *Journal of Environmental Management*, 166, 387-406.
- Liao, X. Y., Chen, T. Bin, Xie, H. and Liu, Y. R. (2005). Soil As contamination and its risk assessment in areas near the industrial districts of Chenzhou City, Southern China. *Environment International*, 31(6), 791-798.
- Lindsay, W. L. and Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42(3), 421-428.
- Loeppert, R. H. and suarez, D. L. (1996). Carbonate and gypsum, in: 'Sparks, D. L., Page, A. L., Sumner, M.E., Tabatabai, M. A. and Helmke, P. A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part3-Chemical Methods*. *Soil Science Society of America Inc., Madison, WI, USA*. (pp. 437-474).
- Mansouri, T. and Golchin, A. (2018). The effects of hematite nanoparticles on the concentrations of arsenic and some micronutrients of corn plant grown in contaminated soils. *Journal of Water and Soil Conservation*, 25(1), 1-34. (In Farsi)
- Mansouri, T., Golchin, A. and Babaakbari Sari, M. (2016). The effect of arsenic on phosphorus, iron, zinc and manganese concentrations in soil and corn plant. *Journal of Water and Soil*, 31(2), 627-643. (In Farsi)
- Marabottini, R., Stazi, S. R., Papp, R., Grego, S. and Moscatelli, M. C. (2013). Mobility and distribution of arsenic in contaminated mine soils and its effects on the microbial pool. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96, 147-153.
- Moscatelli, M. C., Lagomarsino, A., Marinari, S., De Angelis, P. and Grego, S. (2005). Soil microbial indices as bioindicators of environmental changes in a poplar plantation. *Ecological Indicators*, 5(3), 171-179.
- Nelson, D. W. and Sommers, L. E. (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Sparks, D. L., Page, A. L., Helmke, P. A., Loeppert, R. H., Soltanpour, P. N., Tabatabai, M. A., Johnston, C. T. and Sumner, M. E. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2*. *Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA*, pp. 539-579.
- Olsen, S. R. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *United States Department of Agriculture. Washington*.
- Prasad, P., George, J., Masto, R. E., Rout, T. K., Ram, L. C. and Selvi, V. A. (2013). Evaluation of microbial biomass and activity in different soils exposed to increasing level of arsenic pollution: a laboratory study. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22(5), 483-497.
- Rezaie, R. and Raiesi, F. (2016). Effect of superabsorbent polymers on soil microbial respiration and biomass under drought stress condition. *Journal of Sol Biology*, 3(2), 151-162. (In Farsi)
- Shirzadeh, N., Ali-Asghar zad, N. and Najafi, N. (2013). Changes in microbial biomass carbon, ecophysiological indices, basal induced respiration of soil after incubation with - respiration and substrate levels different lead. *Water and Soil Science*, 23(2), 111-124. (In Farsi)
- Shrestha, B., Acosta-Martinez, V., Cox, S. B., Green, M. J., Li, S. and Cañas-Carrell, J. E. (2013). An evaluation of the impact of multiwalled carbon nanotubes on soil microbial community structure and functioning. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 188-197.
- Sumner, M. E. and Miller, W. P. (1996). Cation exchange capacity and exchange coefficients. In: Sparks, D. L., Page, A. L., Helmke, P. A., Loeppert, R. H., Soltanpour, P. N., Tabatabai, M. A., Johnston, C. T., Sumner, M. E. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 3*. *Soil Science Society of America, Inc., Madison, USA*, pp. 1201-1229.
- Wardle, D. A. and Ghani, A. (1995). A critique of the

microbial metabolic quotient ( $qCO_2$ ) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(12), 1601-1610.

- Yang, Y., Campbell, C. D., Clark, L., Cameron, C. M. and Paterson, E. (2006). Microbial indicators of heavy metal contamination in urban and rural soils. *Chemosphere*, 63(11), 1942-1952.
- Yazdan Panah, N., Fotovat, A., Lakzian, A. and

Hagniya, Gh. H. (2008). The effect of heavy metals (Cd and Zn) on microbial respiration in calcareous and non-calcareous soils. *Agricultural Sciences and Technology Journal*, 22(1), 145-135. (In Farsi)

- Zhang, J., Hao, Z., Zhang, Z., Yang, Y. and Xu, X. (2010). Kinetics of nitrate reductive denitrification by nanoscale zero-valent iron. *Process Safety and Environmental Protection*, 88(6), 439-445.