

مقاله پژوهشی

## تأثیر نانو ذرات نقره بر فعالیت میکروبی و جمعیت باکتریایی یک خاک آهکی با استفاده از qPCR

سکینه بالنده<sup>۱</sup> - امیر لکزیان<sup>۲\*</sup> - علی جوادمش<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۳۰

### چکیده

نانوذرات نقره (AgNPs) به دلیل خاصیت ضد میکروبی خود در بسیاری از محصولات تجاری استفاده می‌شوند. با توجه به مصرف بالای AgNPs آزاد شدن آن در محیط زیست دور از انتظار نمی‌باشد. AgNPs به عنوان یک آلاینده نو ظهور پذیرفته شده است و برای اکثر جوامع باکتریایی و قارچی سمی است. اگر چه انتظار می‌رود رفتار AgNPs در محیط پیچیده خاک تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار بگیرد که بر روی خاصیت ضد میکروبی آن تاثیر می‌گذارد. به دلیل آگاهی از خطرات زیست محیطی و ارزیابی اثرات AgNPs بر فعالیت میکروبی خاک آزمایشی با دو شکل نقره (یونی و نانو) در ۲ بازه زمانی انجام شد. غلظت‌های ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم AgNPs و  $AgNO_3$  بر مبنای نقره به هر کیلوگرم خاک خشک اضافه و گرماگذاری شد. تاثیر هر دو ترکیب بر تنفس برانگیخته میکروبی، تعداد باکتری‌های هتروتروف، فعالیت آنزیم اوره‌آز و دهیدروژناز و جمعیت همه باکتری‌های خاک با استفاده از qPCR برآورد شد. در نهایت با استفاده از شاخص‌های زیستی فوق، نمودار شاخص زیستی کیفیت خاک رسم شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت AgNPs و  $AgNO_3$ ، فعالیت دهیدروژناز و اوره‌آز خاک، تنفس برانگیخته میکروبی و تعداد باکتری‌های خاک کاهش پیدا کرد؛ اما با گذشت زمان فقط فعالیت اوره‌آز خاک و جمعیت باکتری‌های هتروتروف افزایش پیدا کرد. نتایج شاخص زیستی کیفیت خاک نشان داد با افزایش غلظت AgNPs و  $AgNO_3$  و گذشت زمان این شاخص نسبت به تیمار شاهد کاهش پیدا کرد. نتایج این پژوهش نشان داد که بازدارندگی نقره به شکل یونی بر فعالیت میکروبی خاک به ویژه فعالیت آنزیم دهیدروژناز بیشتر از شکل نانو آن بود. در حالی که فراوانی نسبی جمعیت باکتریایی خاک کاهش بیشتری در تیمار AgNPs نسبت به تیمار  $AgNO_3$  نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** اوره‌آز، دهیدروژناز، جمعیت باکتریایی، نانو ذرات نقره، qPCR

### مقدمه

نانولوله‌های کربنی چندلایه<sup>۵</sup> و فولرین است که در این میان نانو ذرات نقره (AgNPs) به دلیل رسانایی خوب، پایداری شیمیایی، خواص کاتالیزوری و فتوژنیک و اپتوالکترونیک بسیار مورد توجه هستند (۱۴). نقره گسترده‌ترین نانوذره فلزی (MNPs<sup>۶</sup>) تجاری است که در جواهرسازی، دندان پزشکی، عکاسی، پزشکی، لوازم آرایش، نساجی، بسته‌بندی مواد غذایی، کاتالیزورها و غیره کاربرد دارد (۹). نقره فعال‌ترین فلز بی‌اثر است که سه گونه کاتیونی  $Ag^+$ ،  $Ag^{2+}$ ،  $Ag^{3+}$  تشکیل می‌دهد که در میان آن‌ها فقط شکل یک ظرفیتی نقره از نظر

امروزه گسترده‌گی و تنوع کاربرد فناوری نانو به حدی است که صنعت، کشاورزی، محیط‌زیست، بهداشت و درمان، علوم دارویی، اقتصاد، تغذیه و سایر جنبه‌های زندگی بشر تحت تاثیر آن قرار گرفته است. با وجود روند روبه رشد محصولات تجاری دارای نانو ذرات در حال حاضر تنها از چند ماده در حجم و تعداد بالا در محصولات تجاری استفاده می‌شود که شامل نقره، دی‌اکسید تیتانیوم، اکسید روی، سیلیس، نانو مواد با پایه کربن (نانولوله‌های کربنی تک دیواره<sup>۴</sup>)،

DOI: 10.22067/JSW.2021.67908.1004

4- single-walled nanotubes

5- multi walled carbon nanotubes

6- Metal Nanoparticles

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه فردوسی مشهد

(Email: lakzian@um.ac.ir)

\*- نویسنده مسئول:

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

بر ویژگی‌های بیولوژیکی خاک خواهد داشت (۳۸). از جمله موارد استفاده از نمودارهای رادار در مطالعه خاک می‌توان به بررسی تاثیر سرب بر شاخص فعالیت آنزیمی کل خاک اشاره کرد (۳۲).

شاخص‌های زیستی علاوه بر اینکه تحت تاثیر تغییرات و در هم آمیختگی خاک مانند آلاینده‌ها به سرعت واکنش می‌دهند اندازه‌گیری آن‌ها نیز نسبت به سایر شاخص‌های شیمیایی و فیزیکی هزینه کمتری دارد (۳۱). آنزیم‌های برون سلولی نقش مهمی در چرخه‌های بیوشیمیایی خاک دارند. اوره از به دلیل سه‌م ویژه خود در چرخه نیتروژن در خاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این آنزیم توسط گیاهان، جانوران و ریزجانداران در خاک تولید می‌شود اما تحقیقات نشان داده است ریزجانداران منبع اصلی تولید این آنزیم در خاک می‌باشند (۳۷). آنزیم اوره‌آز به دلیل مشارکت در بزرگ‌ترین چرخه غذایی بیولوژیکی خاک (چرخه نیتروژن) و آنزیم دهیدروژناز به دلیل مشارکت در چرخه کربن در این پژوهش استفاده شدند. علاوه بر این فعالیت دهیدروژناز در ارتباط نزدیک با تنفس میکروبی و کربن زیست‌توده است و به طور غیرمستقیم نشان دهنده فعالیت و توانایی زنده ماندن جمعیت میکروبی خاک تحت تنش است (۳۳). همچنین فعالیت آنزیم دهیدروژناز نشان دهنده اکسیداسیون ترکیبات آلی است و کاهش فعالیت آن می‌تواند تجزیه مواد آلی را تحت تاثیر قرار دهد (۴۵). فعالیت دهیدروژناز به عنوان یک شاخص از سیستم‌های ردکس زیستی است و می‌تواند به عنوان معیاری از شدت متابولیسم میکروبی در خاک استفاده شود (۵۱). باکتری‌های هتروتروف به علت گسترش و فراگیری در اکثر محیط‌های خاکی و عدم وجود شرایط اختصاصی برای رشد آن‌ها در خاک برای سنجش تاثیر نقره انتخاب شدند. همچنین تنفس میکروبی نشان دهنده کارکرد بخش زنده و فعال جامعه میکروبی خاک است بنابراین شاخص مناسبی برای بررسی اثرات آلاینده‌ها در خاک می‌باشد (۳۴). علاوه بر این تنفس برانگیخته خاک در ارتباط نزدیک با زیست‌توده میکروبی خاک می‌باشد و تغییر در آن نشان دهنده تغییرات زیست توده میکروبی است.

با افزایش روبه رشد استفاده از نانو ذرات در صنعت و زندگی روزمره بشر با توجه به عدم اطمینان کامل از بی‌خطر بودن این مواد برای اکوسیستم‌های خاکی به نظر می‌رسد جامعه میکروبی خاک می‌تواند تحت تاثیر این آلاینده‌های نوظهور قرار بگیرد و ارائه خدمات ضروری اکوسیستم را تحت شعاع قرار دهد. از آنجایی که ریزجانداران خاک مسؤل و موتور محرکه بیشتر فعالیت‌هایی هستند که در خاک صورت می‌گیرد، مطالعه تاثیر فلز سنگین نقره چه به صورت ترکیبات عادی (یونی) و چه به صورت نانو ذرات بر ریزجانداران خاک به‌ویژه با توجه به خاصیت ضد میکروبی نقره امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر به نظر می‌رسد.

تاکنون مطالعات اندکی در مورد تاثیر نانو ذرات نقره بر

زیست‌محیطی اهمیت دارد (۸). نترات نقره ( $AgNO_3$ ) ترکیب واسط شیمیایی است که همه ترکیبات دیگر Ag از آن تشکیل می‌گردند و مهم‌ترین ترکیب صنعتی این عنصر محسوب می‌شود. بخش بزرگی از این مواد در نتیجه دفع نامناسب فاضلاب و زباله‌های شهری و پزشکی در نهایت وارد خاک می‌شوند. علاوه بر این استفاده از لجن فاضلاب، کودهای آلی و آفت‌کش‌ها از مهم‌ترین راه‌های ورود AgNPs به زمین‌های کشاورزی می‌باشند (۳).

مطالعات نشان می‌دهند که نقره به هر دو شکل نانو و یونی پس از ورود به بدن مهره‌داران به بافت‌های کبد، شش‌ها و غدد حس بویایی و DNA آسیب می‌رساند و سبب تنش اکسیداتیو در سلول می‌شود (۱، ۵ و ۶). از پیامدهای تماس کرم‌های خاکی و نماتدها با نقره می‌توان به کاهش تولیدمثل، کوچک شدن جثه و تجمع نقره در بافت‌های بدن اشاره کرد (۴۴ و ۴). همچنین نقره به هر دو شکل یونی و نانو باعث اختلال در فتوسنتز و عملکرد عمومی سلول‌ها و ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه می‌شود (۵۷). مهم‌ترین کاربرد نانو ذرات نقره، فعالیت ضد باکتریایی آن‌هاست اما سمیت آن‌ها بر روی قارچ‌ها و ویروس‌ها نیز مشاهده شده است (۱۹). فرضیه‌های متعددی درباره سمیت AgNPs برای ریزجانداران وجود دارد. بیشترین دلیل سمیت این نانو ذرات مربوط به انتشار یون نقره از AgNPs است (۵۶، ۲۵). علاوه بر این تعامل فیزیکی AgNPs با ریزجانداران و تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن می‌تواند یکی از این دلایل باشد (۴۸، ۲۷، ۲۶). تغییر در نفوذپذیری غشا و پتانسیل ردکس در سیتوزول، اختلال در سنتز ATP، افزایش تنش ناشی از تجمع رادیکال‌های آزاد، اختلال در سنتز پروتئین و DNA از دیگر پیامدهای سمیت نقره در سلول باکتری‌ها است (۲۶، ۲۸، ۲۹ و ۴۲). تحقیقات نشان داده است که نقره به هر دو شکل یونی ( $Ag^+$ ) و نانو برای ریزجانداران خاک سمی است (۲۲، ۴۶، ۵۳ و ۵۴). در بین فلزات، نقره سمی‌ترین فلز برای جمعیت میکروبی خاک است (۱۶). همچنین ماندگاری بالا در خاک و احتمال تجمع زیستی در زنجیره غذایی، نقره را به یک خطر زیست‌محیطی تبدیل کرده است (۴۳).

جامعه میکروبی خاک به هرگونه اختلال و عوامل تنش‌زا بسیار حساس است و به سرعت پاسخ می‌دهند. عوامل تنش‌زا می‌توانند سبب تغییر در فعالیت، زیست‌توده و ساختار جامعه میکروبی شوند (۳۱). علاوه بر این فعالیت آنزیمی خاک که بخش اعظمی از آن به عهده ریز جانداران است به دلیل شرکت در چرخه‌های عناصر غذایی معیار مناسبی برای سنجش تاثیر آلاینده‌ها بر فعالیت متابولیکی خاک است. استفاده از شاخص‌های زیستی خاک مانند فعالیت آنزیمی، تنفس میکروبی، تغییرات کمی جمعیت میکروبی و نحوه ارتباط آن‌ها با هم از طریق بررسی شاخص زیستی کیفیت خاک به وسیله نمودارهای رادار کمک شایان توجهی در فهم تاثیرات نقره به هر دو شکل یونی و نانو

فاکتوریل با فاکتورهای؛ ۱ - نوع نقره (یونی و نانو) ۲- غلظت نقره (در ۶ سطح ۰، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم نقره بر کیلوگرم خاک خشک) و ۳- زمان (۷ و ۴۲ روز) انجام شد. سپس نمونه‌های خاک به صورت حذفی در زمان ۷ و ۴۲ روز جهت تعیین تنفس میکروبی برانگیخته، جمعیت باکتری‌های هتروتروف، فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و دهیدروژناز؛ و زمان ۴۲ روز جهت کمی‌سازی جمعیت باکتریایی خاک مورد آنالیز قرار گرفتند.

در این پژوهش برای اندازه‌گیری تنفس برانگیخته میکروبی از روش اندرسون و دامش (۲)، شمارش باکتری‌های هتروتروف از روش سامارجیو و همکاران (۴۵)، فعالیت آنزیم اوره‌آز از روش طباطبایی و برمنر (۵۰)، فعالیت آنزیم دهیدروژناز از روش اصلاح شده تالمان (۵۲)، شاخص زیستی کیفیت خاک از روش حسینی و همکاران (۲۳) و استخراج DNA از نمونه‌های خاک از روش بهینه شده ژو و همکاران (۶۰) استفاده شد. همچنین جهت آنالیز کمی روش Real time qPCR نسبی مطابق با استاندارد MIQE (۷) عمل شد. جهت تکثیر قطعات ژن 16S rDNA باکتری‌های خاک از جفت آغازگر همگانی باکتریایی (PLK1/PLK2) که قسمتی از منطقه متغیر V3 توالی‌های ژن 16S rDNA باکتریایی را تکثیر می‌کند (۵۹)، استفاده شد (جدول ۱).

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری JMP 8 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

به منظور محاسبه شاخص کیفیت زیستی خاک مطابق با دستورالعمل زیر استفاده شد. با توجه به اینکه پارامترهای زیستی به کار رفته در این پژوهش دارای واحدهای مختلفی می‌باشند ابتدا همه پارامترها بی بعد شدند. برای این منظور بیشترین مقدار هر پارامتر، یک در نظر گرفته شد و مقادیر بقیه پارامتر به بیشترین عدد تقسیم شدند. سپس نمرات مربوط به هر پارامتر در غلظت‌های مختلف هر دو تیمار به صورت نمودار رادار نمایش داده شد. پس از رسم نمودار از مساحت چند ضلعی ایجاد شده توسط شاخص‌های زیستی در نمودار رادار برای مقایسه گرافیکی و آماری تیمارها به وسیله نرم‌افزار Nitro Pro استفاده شد.

ویژگی‌های بیولوژیکی خاک‌های آهکی صورت گرفته است و در پژوهش‌های صورت گرفته نیز تغییرات جمعیت میکروبی خاک توسط روش‌های مولکولی مورد بررسی قرار نگرفته است. فرضیات پژوهش حاضر عبارت است از: ۱- نانو ذرات نقره نسبت به نیترات نقره اثر بازدارنده بیشتری بر فعالیت میکروبی خاک دارد و ۲- نقره (یونی، نانو) می‌تواند ترکیب نسبی جمعیت باکتریایی خاک را نسبت به تیمار شاهد تغییر دهد؛ بنابراین این پژوهش با هدف مقایسه تأثیر شکل یونی و نانو نقره بر شاخص‌های بیولوژیکی خاک (تنفس برانگیخته میکروبی، شمارش باکتری‌های هتروتروف، فعالیت آنزیم اوره‌آز و دهیدروژناز و شاخص زیستی کیفیت خاک) و بررسی تغییرات کمی جمعیت باکتریایی خاک انجام شد.

## مواد و روش‌ها

خاک مورد مطالعه از عمق ۰ تا ۱۵ سانتی‌متری محلی واقع در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد با رده‌بندی *Typic Haplocambids* تهیه و پس از هوا خشک شدن و عبور از الک ۲ میلی‌متری به آزمایشگاه منتقل شد. برخی از ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک مورد مطالعه با استفاده از روش‌های استاندارد آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد (جدول ۲). AgNPs از شرکت مهرگان شیمی تهیه شد و از لحاظ شکل ظاهری ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی (TEM) و متوسط اندازه ذرات مورد بررسی قرار گرفت.

جهت آماده‌سازی تیمارها ابتدا نمونه‌های ۱۰۰ گرمی خاک با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (AgNPs) (۰، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم نقره در کیلوگرم خاک خشک) و نیترات نقره (AgNO<sub>3</sub>) (۰، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم نقره در کیلوگرم خاک خشک) تیمار شدند. برای هر کدام از غلظت‌ها مقدار تیمار مورد نظر برای ۶۰۰ گرم خاک وزن شد و پس از هم زدن و یکنواخت شدن به قسمت‌های ۱۰۰ گرمی تقسیم شدند. در نهایت هر تیمار با ۳ تکرار ۱۰۰ گرمی به صورت مجزا برای دو زمان ۷ و ۴۲ روز آماده شدند و سپس نمونه‌های خاک در ظروف پلی‌اتیلنی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت معادل ۶۰ درصد ظرفیت نگهداشت رطوبتی خاک در تاریکی گرم‌گذاری شدند. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر منطقه متغیر V3 توالی‌های ژن 16S rDNA باکتریایی

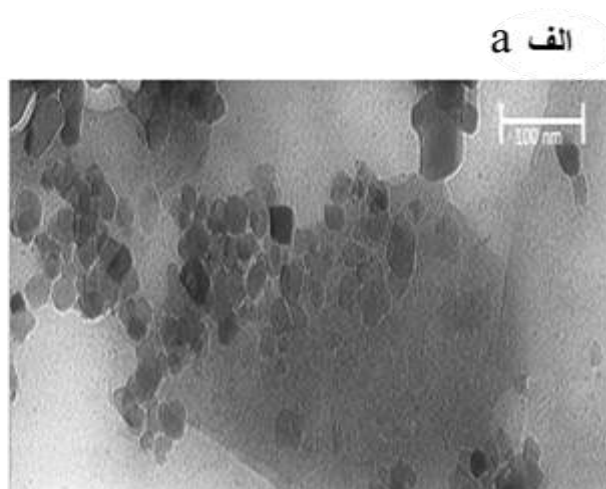
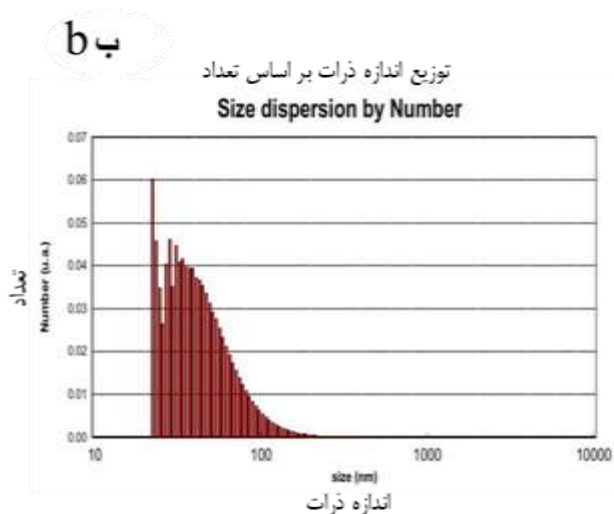
Table 1- Primers used to amplify the V3 variable region of bacterial 16S rDNA gene sequences

توالی (Sequence)	نام آغازگر (primer)
5' TACGGGAGGCAGCAGT 3'	PLK1
5' TATTACCGCGTCTGCT 3'	PLK2

جدول ۲- برخی از ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک مورد مطالعه

Table 2- Some physical, chemical and biological properties of the studied soil

جمعیت باکتری‌های هتروتروف Heterotrophic bacterial population (CFU (log <sub>10</sub> ) g <sup>-1</sup> soil)	تنفس برانگیخته میکروبی Substrate-induced respiration (mg CO g <sup>-1</sup> soil h <sup>-1</sup> )	آهک Calcium carbonate (%)	هدایت الکتریکی Electrical conductivity (dS m <sup>-1</sup> )	pH	رس Clay (%)	سیلت Silt (%)	شن Sand (%)
6.013	0.0045	14.5	2.01	7.71	33.12	38.16	28.72
فعالیت آنزیم اوره‌آز Urease activity (μg NH <sub>4</sub> -N g <sup>-1</sup> soil h <sup>-1</sup> )	فعالیت آنزیم دهیدروژناز Dehydrogenase activity (μg TPF g <sup>-1</sup> soil 16 h <sup>-1</sup> )	FC (g.g <sup>-1</sup> )	ظرفیت تبادل کاتیونی Cation exchange capacity (Cmol <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> soil)	کربن آلی Organic carbon (%)	پتاسیم قابل دسترس Available potassium (mg kg <sup>-1</sup> )	فسفر قابل دسترس Available phosphorus (mg kg <sup>-1</sup> )	نیتروژن کل Total nitrogen (mg kg <sup>-1</sup> )
73	0.1843	27.19	8.69	0.273	206	18.29	1085



شکل ۱- الف. تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) AgNPs (TEM) ب. توزیع اندازه ذرات AgNPs  
Figure 1- a. Electron Microscope (TEM) Image of AgNPs b. Particle size distribution of AgNPs

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از مطالعه تاثیر AgNPs و AgNO<sub>3</sub> بر جمعیت باکتری‌های هتروتروف در شکل ۲ نشان داده شده است. در تیمارهای نانو به جز غلظت ۵ میلی گرم در کیلوگرم، با گذشت زمان جمعیت باکتری‌های هتروتروف افزایش یافت. در تیمارهای غیر نانو نیز به جز دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، با گذشت زمان جمعیت افزایش یافت. البته باید گفت که اختلاف بین دو زمان ۷ و ۴۲ روز (به جز سطح ۵۰ و ۱۰۰ تیمار نانو) از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل ۲). نتایج به طور کلی نشان دهنده سازگاری جمعیت میکروبی هتروتروف خاک در طی زمان نسبت به ترکیبات وارد شده است؛ که دلایل این امر احتمالاً کاهش خاصیت آنتی‌باکتریایی این ترکیبات، مقاوم شدن ریزجانداران خاک در طی زمان و یا ظهور گونه‌های مقاوم می‌باشد. سامارجیو و همکاران (۴۵) اثر غلظت‌های مختلف AgNPs را بر

برخی از ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک استفاده شده در این آزمایش قبل از اعمال تیمارها در جدول ۲ نشان داده شده است. بافت خاک مورد مطالعه لوم رسی، pH آن قلیایی و کربنات کلسیم معادل آن ۱۴ درصد بود. AgNPs به کار رفته در این پژوهش دارای ۳ درصد پوشش پلی وینیل پیرولیدون<sup>۱</sup>، از منبع نیترات نقره، دارای شکل ظاهری کروی و متوسط اندازه ذرات آن بین ۳۰-۴۰ نانومتر بود (شکل ۱).

## تأثیر AgNPs و AgNO<sub>3</sub> بر جمعیت باکتری‌های هتروتروف

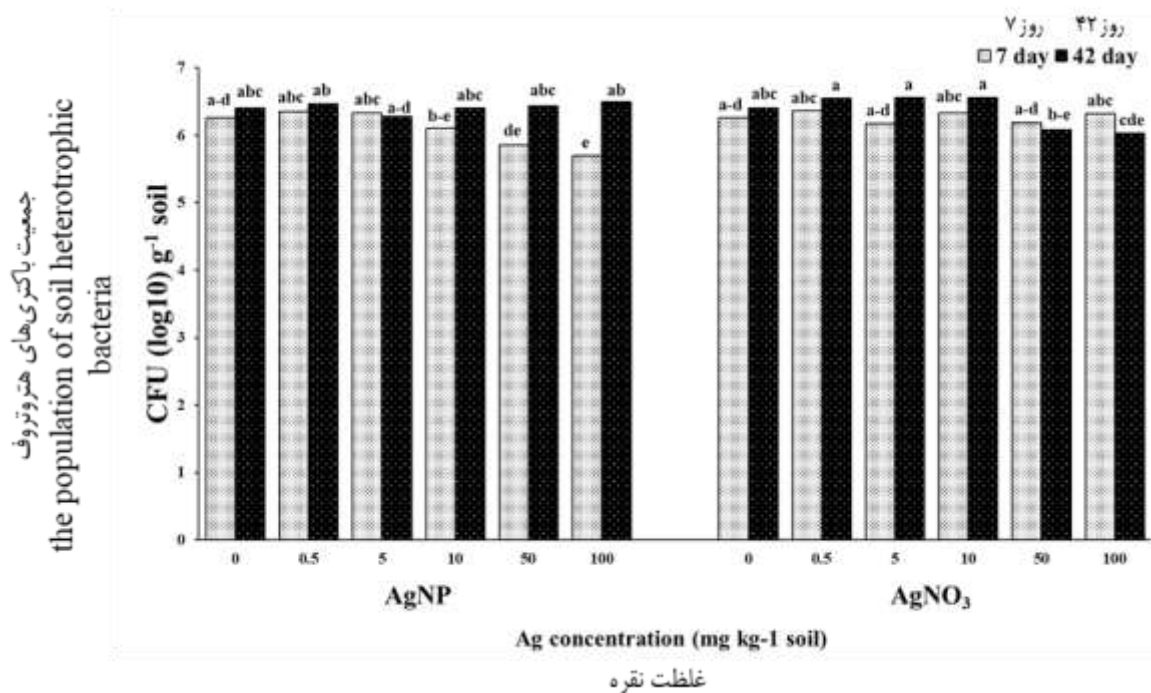
1- Polyvinylpyrrolidone

بهبود رشد میکروبی شود. به نظر می‌رسد احتمالاً همین عامل در غلظت‌های بالای نقره در تیمار یونی بخشی از اثرات سمی نقره را با افزایش رشد جمعیت میکروبی پوشش داده است و سبب کاهش اثر بازدارنده  $AgNO_3$  نسبت به AgNPs شده است.

### تنفس میکروبی برانگیخته

در هر دو ترکیب مورد استفاده تا غلظت ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم، با گذشت زمان تنفس میکروبی برانگیخته کاهش معنی‌داری داشت؛ که این کاهش در تیمار نانو تا غلظت ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ادامه داشت. به تدریج و با افزایش غلظت این دو ترکیب در خاک روند عکس مشاهده شد و با گذشت زمان تنفس میکروبی افزایش معنی‌دار یافت (شکل ۳). با وجود روندهای ذکر شده نتایج نشان داد که به طور کلی بیشترین مقدار تنفس میکروبی برانگیخته در غلظت‌های کم این دو ترکیب بود. احتمال می‌رود این افزایش در میزان تنفس در غلظت‌های بالا هر دو ترکیب در روز چهارم و دوم به علت ظهور گونه‌های مقاوم به تنش و یا تغییر در ترکیب جامعه میکروبی خاک باشد (۲۱).

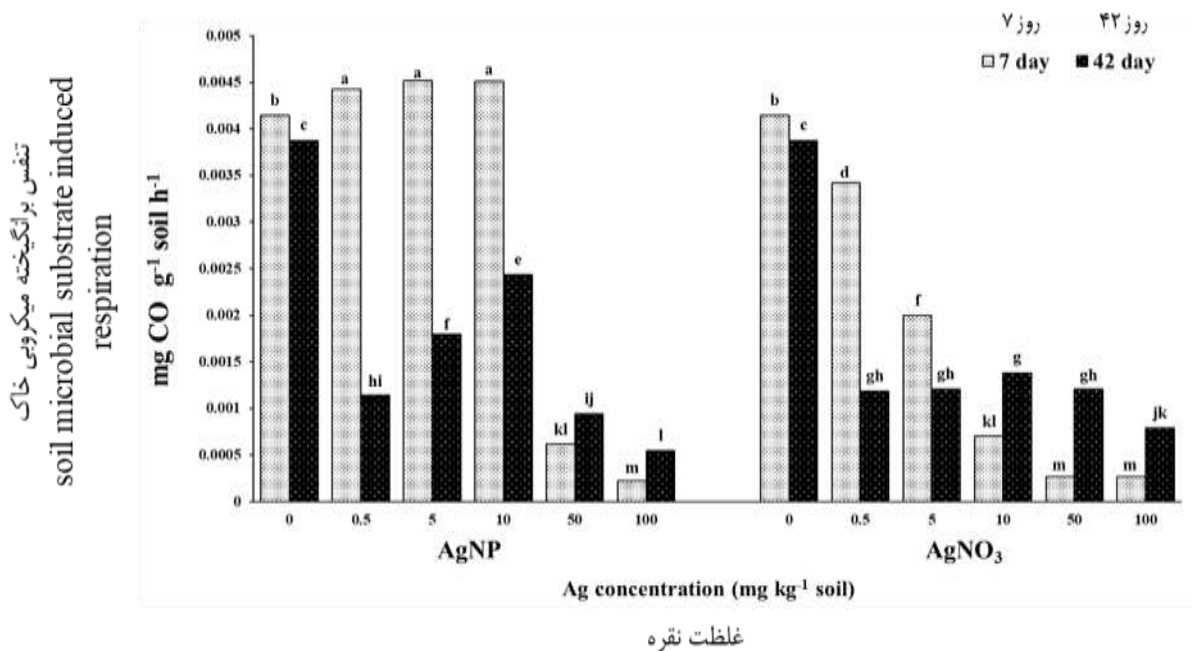
فعالیت و جمعیت میکروبی خاک مطالعه کردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که جمعیت باکتری‌های هتروتروف خاک در غلظت‌های بیشتر از ۴۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم AgNPs در روز چهارم و نهم آنکوباسیون نسبت به شاهد افزایش داشته است که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت داشت. آن‌ها ظهور گونه‌های مقاوم به AgNPs در خاک را دلیل افزایش جمعیت باکتری‌های هتروتروف گزارش کرده‌اند. چارلی و بورن (۱۳) با مطالعه تجمع زیستی نقره در باکتری‌ها استخراج شده از خاک و رشد آن‌ها در محیط‌های کشت خالص گزارش کردند با وجود استفاده گسترده از نقره به عنوان یک ماده ضد باکتریایی، برخی از باکتری‌های هتروتروف خاک حتی به سطوح بالای نقره تحمل نشان می‌دهند. این طور به نظر می‌رسد که با از بین رفتن گونه‌های حساس به تنش، علاوه بر فراهم شدن منابع غذایی جدید، رقابت برای کسب منابع غذایی و محل زندگی در بین ریزجانداران باقی مانده کاهش می‌یابد و در نتیجه احتمالاً شاهد افزایش جمعیت گونه‌های مقاوم به تنش خواهیم بود (۲۰). علاوه بر این برخی از باکتری‌ها در معرض AgNPs با گذشت زمان پروتئین‌های خاصی مانند فلاژنین تولید می‌کنند که باعث تجمع AgNPs می‌شود و خاصیت آنتی باکتریایی این نانوذرات را کاهش می‌دهد (۳۶). علاوه بر این یون نیترات همراه با تیمار  $AgNO_3$  می‌تواند تا حدودی سبب



شکل ۲- اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف AgNPs و  $AgNO_3$  بر جمعیت باکتری‌های هتروتروف خاک (مقادیر حاصل از میانگین ۳ تکرار هستند). میانگین‌ها با حروف غیرمشابه دارای تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

**Figure 2- Interaction of different times and concentrations of AgNPs and  $AgNO_3$  on the population of soil heterotrophic bacteria**

(Values obtained from the mean of 3 replicates). The means with dissimilar letters have a significant difference at the level of 5% probability.



شکل ۳- اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف AgNPs و AgNO<sub>3</sub> بر تنفس برانگیخته میکروبی خاک

(مقادیر حاصل از میانگین ۳ تکرار هستند). میانگین‌ها با حروف غیرمشابه دارای تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

**Figure 3- Interaction of time and different concentrations of AgNPs and AgNO<sub>3</sub> on soil microbial substrate induced respiration**

(Values obtained from the mean of 3 replicates). The means with dissimilar letters have a significant difference at the level of 5% probability.

در محلول خاک ناشی از اکسید شدن AgNPs و انحلال AgNO<sub>3</sub> ممکن است در طی زمان جذب سطحی ذرات خاک شوند و یا با ترکیبات آلی تشکیل لیگاند دهند و دسترسی زیستی آن‌ها کاهش یابد. همچنین با تشکیل ترکیبات نامحلول نقره از جمله سولفید شدن نقره و کاهش دسترسی زیستی، سمیت نقره برای جامعه میکروبی خاک کاهش پیدا می‌کند (۱۷).

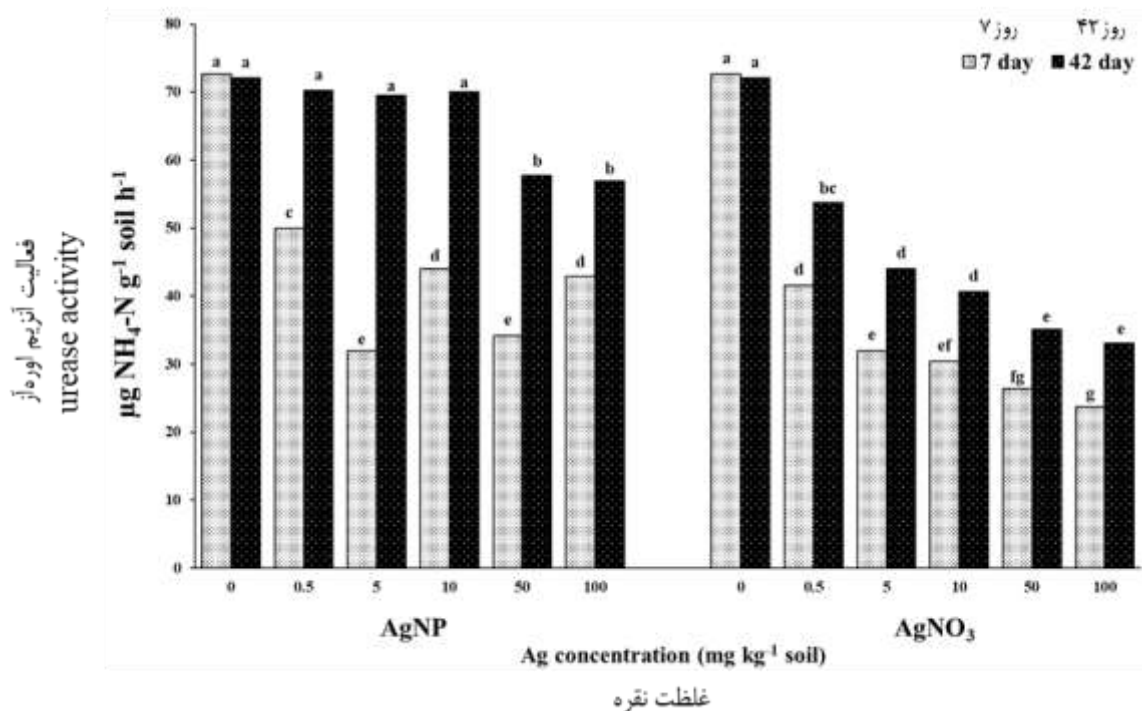
#### فعالیت آنزیم اوره‌آز

در هر دو ترکیب مورد استفاده تمام غلظت‌ها در هر دو زمان مورد بررسی (به جز غلظت‌های ۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم AgNPs در زمان ۴۲ روز که تفاوت معنی‌دار با شاهد نداشتند) موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم اوره‌آز نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۴). درصد کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز در ترکیب AgNO<sub>3</sub> با افزایش غلظت در هر دو زمان مورد بررسی افزایش یافت. این روند کاهش در ترکیب AgNPs در روز چهل و دوم هم مشاهده شد ولی در زمان هفتم روند مشخصی نداشت. علاوه بر این مقدار فعالیت آنزیم اوره‌آز در حضور AgNPs و AgNO<sub>3</sub> در روز هفتم آنکوباسیون به طور معنی‌داری کمتر از روز چهل و دوم آنکوباسیون بود. این نتایج در

هنج و امرلینگ (۲۱) با مطالعه تاثیر نقره بر فعالیت جامعه میکروبی خاک گزارش کردند در یک خاک آلوده به نقره، تیمارهایی که دارای مقادیر کمتر از دوزهای کشنده هستند با کاهش کارایی استفاده از بستره در ریزجانداران، تنفس برانگیخته میکروبی را کاهش می‌دهند. همچنین زمانی که ریزجانداران در معرض تماس با یک آلاینده مانند نقره قرار می‌گیرند جهت حفظ بقای خود، در ابتدا بیشتر انرژی خود را صرف تنفس می‌کنند تا اثر بازدارنده آن را کاهش دهند در این حالت اگرچه ریزجاندار از لحاظ فیزیکی فعال است اما تکثیر پیدا نمی‌کند (۲۴). در غلظت‌های کم AgNPs در روز هفتم این روش دفاعی به خوبی مشاهده می‌شود. علاوه بر این مطالعات نشان می‌دهد که AgNPs در مقایسه با AgNO<sub>3</sub> تحرک کمی در خاک دارد و با توجه به اینکه در تماس با کدام بخش خاک (مواد آلی، رس، ریزجانداران) باشد تاثیر متفاوتی خواهد داشت (۴۱). اینطور به نظر می‌رسد که به دلیل دسترسی زیستی بیشتر یون نقره در تیمار AgNO<sub>3</sub> نسبت به AgNPs در تمامی غلظت‌ها اثر کاهنده بیشتری بر تنفس برانگیخته میکروبی داشته است نانوذرات با گذشت زمان از شکل نانو به توده<sup>۱</sup> تغییر ماهیت می‌دهند و خصوصیات مربوط به شکل نانو در آن‌ها کاهش پیدا می‌کند. علاوه بر این یون‌های نقره آزاد

و همکاران (۴۰) علی‌رغم تشابه زیاد خاک مورد مطالعه آن‌ها با خاک مورد استفاده در این آزمایش با نتایج تحقیق پیش رو مطابقت نداشت. در مطالعه این محققین ترکیب AgNPs اثر بازدارنده بیشتری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز نسبت به  $AgNO_3$  داشت که می‌توان دلیل آن را تفاوت در اندازه نانو ذرات به کار رفته در پژوهش پیش رو دانست. هرچه AgNPs به کار رفته کوچک‌تر باشد آسیب‌های زیست‌محیطی آن بیشتر خواهد بود. همچنین تفاوت در درصد ظرفیت تبادل کاتیونی، کربن آلی و نحوه آلوده کردن خاک با AgNPs نیز می‌تواند در اختلاف نتایج تأثیرگذار باشد. در نتیجه بنا بر مطالب گفته شده و با توجه به این که اوره‌آز یک آنزیم برون سلولی است و تحت تأثیر جمعیت میکروبی زنده نیست و توسط طیف گسترده‌ای از ریزجانداران تولید می‌شود، به دلیل کاهش دسترسی زیستی نقره در طی زمان به وسیله جذب سطحی ذرات خاک و مواد آلی و تشکیل ترکیبات نامحلول کاهش اثر بازدارندگی نقره و افزایش فعالیت اوره‌آز در هر دو تیمار در زمان ۴۲ روز در هر دو تیمار توجیه‌پذیر است. بنابراین از دلایل افزایش بازدارندگی فعالیت اوره‌آز با افزایش غلظت در هر دو ترکیب می‌توان به افزایش دسترسی زیستی نقره به دلیل افزایش فراوانی آن‌ها اشاره کرد.

راستای با نتایج پژوهش شین و همکاران (۴۷) است. آن‌ها گزارش کردند که بیشترین بازدارندگی فعالیت آنزیم اوره‌آز تحت تأثیر نقره در یک بازه زمانی ۷ روزه رخ می‌دهد. AgNPs علاوه بر انتشار  $Ag^+$  به دلیل ماهیت ویژه خود نیز اثر بازدارنده بر فعالیت آنزیمی خاک دارند (۳۹ و ۴۷). اینطور به نظر می‌رسد که استفاده از شکل جامد و عدم پراکندگی یکنواخت AgNPs و تحرک پایین آن در خاک و زمان بر بودن اکسید شدن و انتشار یون نقره از آن نسبت به یون نقره موجود در تیمار  $AgNO_3$  سبب کاهش دسترسی زیستی تیمار AgNPs و در نتیجه سبب کاهش اثر بازدارنده آن بر فعالیت آنزیم اوره‌آز نسبت به تیمار  $AgNO_3$  شده است. بررسی تأثیر ۲۰ عنصر کمیاب بر فعالیت آنزیم اوره‌آز حاکی از آن است که فعالیت اوره‌آز به طیف وسیعی از کاتیون‌های فلزی واکنش نشان می‌دهد که در میان آن‌ها  $Ag^+$  بیشترین تأثیر بازدارندگی را بر فعالیت اوره‌آز دارد (۵۰). نقره با اتصال به گروه‌های تیول (مانند -SH) به عنوان یک بازدارنده غیررقابتی عمل می‌کند و فعالیت آنزیم اوره‌آز را کاهش می‌دهد (۳۰ و ۱۰). رحمت پور و همکاران (۴۰) با بررسی غلظت‌های مختلف AgNPs و  $AgNO_3$  بر فعالیت آنزیم اوره‌آز گزارش کردند که با افزایش غلظت در هر دو ترکیب فعالیت آنزیم اوره‌آز کاهش پیدا کرد. نتایج رحمت پور



شکل ۴- اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف AgNPs و  $AgNO_3$  بر فعالیت آنزیم اوره‌آز

(مقادیر حاصل از میانگین ۳ تکرار هستند). میانگین‌ها با حروف غیرمشابه دارای تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

**Figure 4- Interaction of time and different concentrations of AgNPs and  $AgNO_3$  on urease activity** (Values obtained from mean 3 replicates). The means with dissimilar letters have a significant difference at the level of 5% probability.

### فعالیت آنزیم دهیدروژناز

گزارش کردند که AgNPs و یون  $Ag^+$  حاصل از آن با پیوند قوی‌ای به پروتئین‌ها متصل می‌شوند که بیش از ۶۰ درصد این پروتئین‌ها آنزیم بودند. AgNPs و یون  $Ag^+$  پس از پیوند با آنزیم با اشغال و یا تغییر جایگاه فعال سبب کاهش قابل ملاحظه فعالیت آنزیمی می‌شود. هرگونه آشفستگی و اختلال در وضعیت طبیعی اکسیداسیون-احیا (رداکس)، از طریق تولید پراکسید و رادیکال‌های آزاد، منجر به تولید اثرات سمی و آسیب به تمامی اجزاء و ساختارهای درون سلولی، از جمله پروتئین‌ها، لیپید و DNA می‌گردد (۱۳). یکی از دلایل اصلی افزایش بازدارندگی فعالیت آنزیم دهیدروژناز با افزایش غلظت نقره در هر دو ترکیب این است که با افزایش میزان نقره سمیت آن برای ریزجانداران خاک که مسئول اصلی تولید آنزیم دهیدروژناز هستند افزایش می‌یابد و در نهایت با کاهش جمعیت میکروبی فعالیت آنزیم دهیدروژناز کاهش می‌یابد.

### اثر نانو ذرات و نیترات نقره بر شاخص بیولوژیکی کیفیت خاک (SBQI)

نتایج غلظت‌های مختلف AgNPs و  $AgNO_3$  بر شاخص بیولوژیکی کیفیت خاک در روز هفتم و چهل و دوم انکوباسیون در شکل ۶ و ۷ نشان داده شده است. تمام غلظت‌های هر دو ترکیب در هر دو زمان مورد بررسی (به جز تیمارهای ۰/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم AgNPs در روز هفتم انکوباسیون) موجب کاهش شاخص SBQI نسبت به تیمار شاهد شدند. تیمار  $AgNO_3$  نسبت به AgNPs در هر دو زمان انکوباسیون و در تمامی غلظت‌ها اثر بازدارنده بیشتری بر شاخص SBQI داشت. با گذشت زمان در روز چهل و دوم انکوباسیون در غلظت‌های کم (۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) هر دو ترکیب، شاخص SBQI نسبت به روز هفتم کاهش پیدا کرد اما در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نقره در هر دو ترکیب نسبت به روز هفتم افزایش پیدا کرد که ممکن است به دلیل ظهور گونه‌های مقاوم به تنش در این بازه زمانی در غلظت‌های بالای نقره باشد. همچنین نتایج نشان داد که  $AgNO_3$  برخلاف AgNPs حتی در غلظت‌های کم اثر بازدارنده بر فعالیت‌های میکروبی خاک دارد که احتمالاً به دلیل دسترسی زیستی بیشتر یون نقره در این ترکیب می‌باشد.

استفاده از منحنی‌های رادار برای نشان دادن تاثیر شرایط مدیریتی و محیطی متفاوت بر کیفیت خاک امروزه در حال افزایش است (۳۸). در این پژوهش ویژگی‌های بیولوژیکی با هم ترکیب شده و به صورت نمودار رادار نمایش داده شدند و از مساحت تشکیل شده بین ویژگی‌های بیولوژیکی در نمودار به عنوان شاخص SBQI استفاده

همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود در هر دو ترکیب مورد استفاده در هر دو زمان تمام غلظت‌ها (به جز غلظت‌های ۰/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم AgNPs در روز هفتم) موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم دهیدروژناز نسبت به تیمار شاهد شدند. غلظت‌های ۰/۵، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم  $AgNO_3$  در روز هفتم انکوباسیون به ترتیب موجب کاهش ۹، ۷۵، ۸۵، ۹۸ و ۹۹ درصدی و در روز چهل و دوم انکوباسیون موجب کاهش ۸۶، ۹۳، ۹۷، ۹۹ و ۹۷ درصدی فعالیت آنزیم دهیدروژناز نسبت به تیمار شاهد شدند که نشان دهنده کاهش بیشتر فعالیت دهیدروژناز با افزایش غلظت  $AgNO_3$  است. مشابه با فعالیت آنزیم اوره‌آز، اثر بازدارندگی ترکیب  $AgNO_3$  بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز بیشتر از تیمارهای AgNPs بود. برخلاف اوره‌آز، فعالیت دهیدروژناز به غلظت کم نقره به ویژه در تیمار AgNPs در کوتاه‌مدت حساسیت کمی داشت. افزایش اولیه فعالیت دهیدروژناز در غلظت‌های کمتر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم AgNPs در روز هفتم انکوباسیون در مطالعات شین و همکاران (۴۷) نیز مشاهده شده است. سامارجیو و همکاران (۴۵) و شین و همکاران (۴۷) با بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف AgNPs بر فعالیت آنزیمی خاک گزارش کردند که با افزایش غلظت AgNPs و همچنین گذشت زمان فعالیت آنزیم دهیدروژناز کاهش می‌یابد که این نتایج هم‌راستا با نتایج پژوهش پیش رو بود. موراتا و همکاران (۳۲) تاثیر ۳ فلز سنگین (Ag, Cu, Pb) را بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز مطالعه کردند. نتایج این محققان نشان داد که نقره به شکل  $AgNO_3$  بیشترین بازدارندگی را بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز در بین این فلزات دارد. همچنین مطالعات آن‌ها نشان داد که در مطالعه سمیت فلزات در خاک باید به حلالیت و اثر متقابل آن‌ها با مواد آلی و زیست‌فراهمی آن‌ها نیز توجه کرد که در این پژوهش یون نقره احتمالاً به علت حلالیت و زیست‌فراهمی بیشتر در تیمار  $AgNO_3$  نسبت به AgNPs اثر بازدارندگی بیشتری بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز داشته است. آنزیم دهیدروژناز به علت حساسیت بالا شاخص مناسبی برای ارزیابی آلودگی فلزات در خاک است (۳۵). در پژوهش حاضر این موضوع با کاهش ۹۹ درصدی فعالیت دهیدروژناز در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم  $AgNO_3$  نسبت به شاهد در روز هفتم انکوباسیون به خوبی نشان داده شده است. یون نقره با بلاک کردن گروه‌های تیول آنزیم (مانند NADH دهیدروژناز II) در چرخه تنفس باعث تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و تنش اکسیداتیو در داخل سلول می‌شود. ویگینتون و همکاران (۵۵) با مطالعه تاثیر پیوند AgNPs با پروتئین‌های باکتریایی و پیامد آن بر فعالیت آنزیمی



نقره در هر دو ترکیب اثر کاهنده بر جمعیت نسبی باکتریایی خاک دارد (شکل ۸). غلظت‌های ۰/۵، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم  $AgNO_3$  و  $AgNPs$  به ترتیب موجب کاهش (۲۲، ۴۰، ۵۹، ۷۳ و ۸۲)؛ (۱۰، ۳۰، ۶۸، ۷۶ و ۸۶) درصدی جمعیت نسبی باکتریایی خاک نسبت به تیمار شاهد شدند. این نتایج نشان می‌دهد که تیمار  $AgNPs$  در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر بازدارنده بیشتری نسبت به تیمار  $AgNO_3$  بر جمعیت نسبی باکتریایی خاک داشته است با این وجود در غلظت‌های مشابه تفاوت معنی‌داری ( $p > 0.05$ ) بین دو تیمار وجود نداشت.

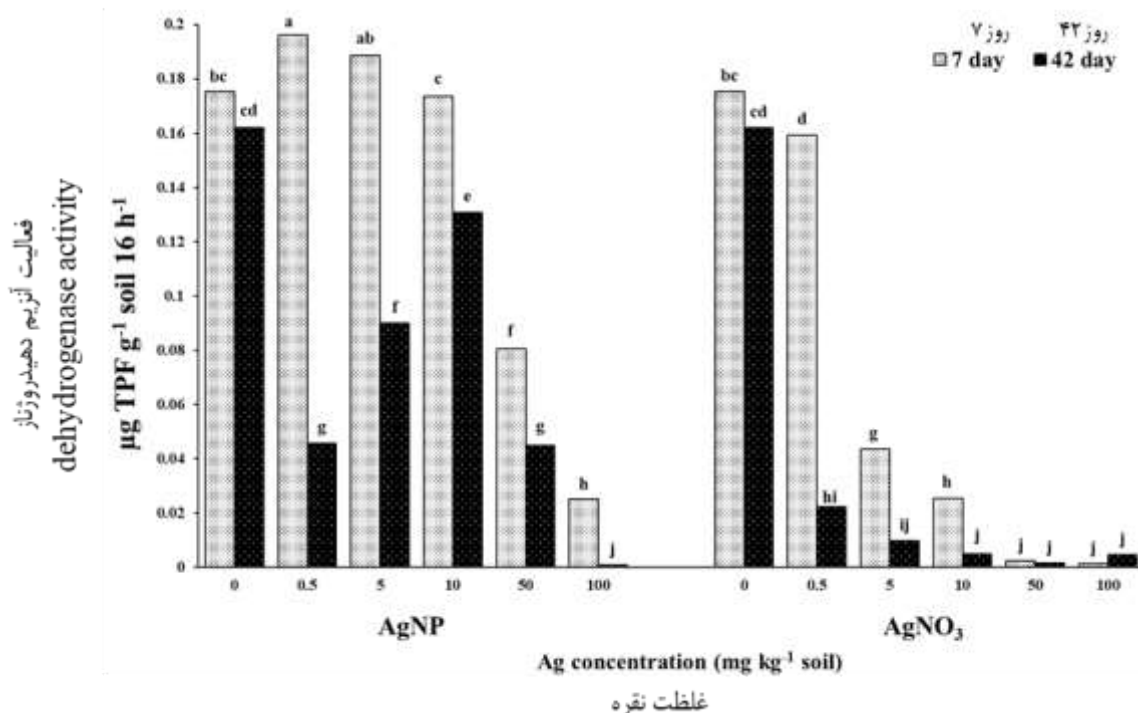
تحقیقات بسیاری اثرات منفی  $AgNPs$  بر ساختار جمعیت میکروبی را در محیط‌های مختلف گزارش کرده‌اند. سامارجیو و همکاران (۴۵) با بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف  $AgNPs$  بر ساختار جمعیت میکروبی خاک گزارش کردند که  $AgNPs$  سبب تغییر در تنوع و کاهش جمعیت نسبی میکروبی خاک می‌شود. در آزمایش این پژوهشگران کاهش تنوع جمعیت میکروبی سودمند خاک حتی در کمترین غلظت به کار رفته (۴۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم  $AgNPs$ ) نیز مشاهده شد.

شده. منحنی شاخص زیستی کیفیت خاک نشان داد که نقره به هر دو شکل یونی و نانو بیشترین اثر بازدارندگی را بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز و تنفس برانگیخته میکروبی خاک داشت. از آنجایی که فعالیت دهیدروژناز در ارتباط نزدیک با تنفس میکروبی است و تنفس میکروبی نشان دهنده کارکرد بخش زنده و فعال جامعه میکروبی خاک می‌باشد (۳۳ و ۳۴) شاخص بیولوژیکی کیفیت خاک به خوبی نشان دهنده سمیت هر دو ترکیب نقره برای جامعه میکروبی خاک است. اینطور به نظر می‌رسد که در حضور غلظت‌های بالای نقره در هر دو ترکیب با حذف و یا کاهش جمعیت میکروبی حساس به تنش و کاهش رقابت بین ریزجانداران، جایگاه‌های جدیدی برای جمعیت باقی‌مانده ایجاد می‌شود که این امر جمعیت مقاوم به تنش را در طی زمان افزایش می‌دهد و جمعیت باقی‌مانده با توجه به توانایی‌های خود کارکردهای اکوسیستم را به عهده می‌گیرند.

### اثر نانو ذرات و نیترات نقره بر فراوانی نسبی باکتری‌های

#### خاک بر اساس 16S rDNA

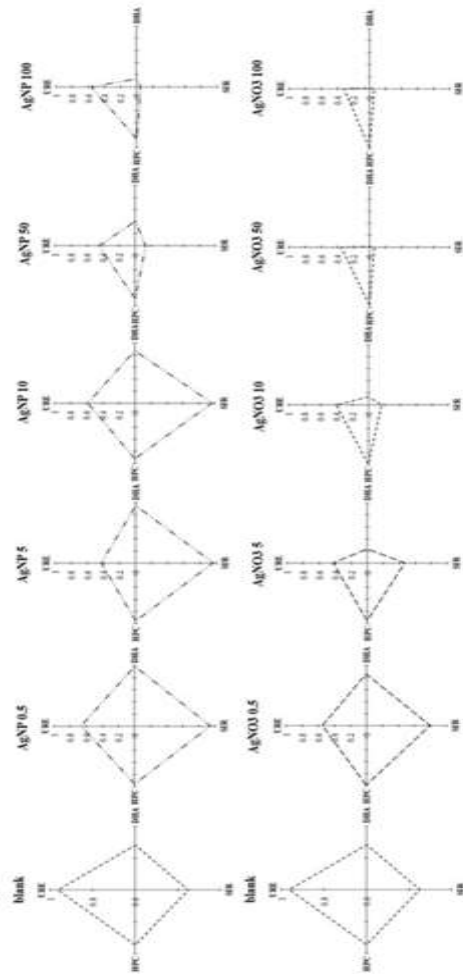
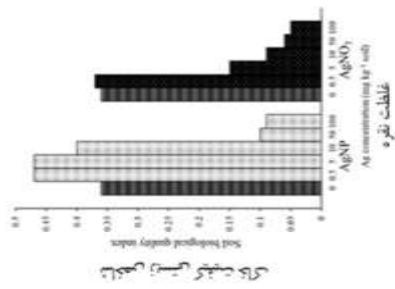
اثر غلظت‌های مختلف  $AgNO_3$  و  $AgNPs$  بر فراوانی نسبی باکتریایی خاک بر اساس 16S rDNA نشان داد که افزایش غلظت



شکل ۵- اثر متقابل زمان و غلظت‌های مختلف  $AgNO_3$  و  $AgNPs$  بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز

(مقادیر حاصل از میانگین ۳ تکرار هستند). میانگین‌ها با حروف غیرمشابه دارای تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

**Figure 5- Interaction of time and different concentrations of  $AgNPs$  and  $AgNO_3$  on dehydrogenase activity** (Values are the mean of 3 replicates). The means with dissimilar letters have a significant difference at the level of 5% probability.



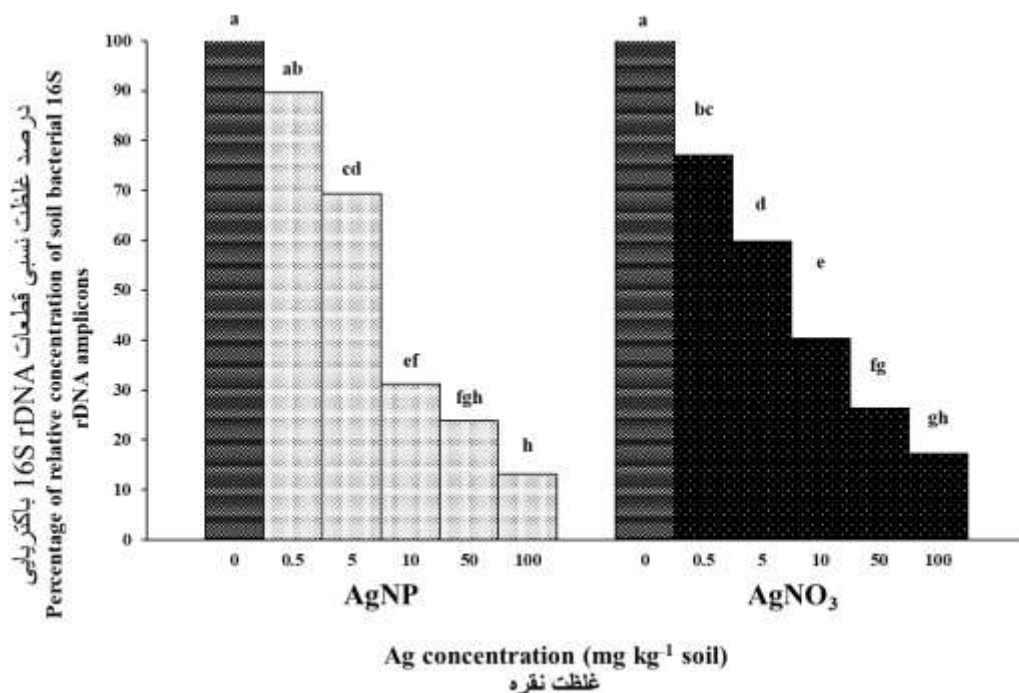
شکل ۶ - تاثیر غلظت‌های مختلف AgNO<sub>3</sub> و AgNPs بر شاخص کیفیت بیولوژیکی خاک در روز هفتم انکوباسیون

Figure 5- The effect of different concentrations of AgNPs and AgNO<sub>3</sub> on soil biological quality index on the seventh day of incubation  
The figure on the right shows the area of the polygons formed at different concentrations of AgNPs and AgNO<sub>3</sub>, (DHA delhydrogenase activity, SIR microbial substrate induced respiration, URE urease activity).



وجود این که از لحاظ فیزیکی قابل اندازه‌گیری هستند اما توانایی رشد و تکثیر خود را از دست می‌دهند (۲۴). در واقع با مرور زمان به دلیل عدم قابلیت تکثیر جمعیت باکتری‌ها کاهش پیدا می‌کند و تنها گونه‌های مقاوم و سازگار باقی خواهند ماند. کارلسون (۱۱) با بررسی اثر نانو ذرات نقره بر سلول باکتریایی گزارش کرد که AgNPs نسبت به یون نقره با تولید بیشتر گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن سبب رهاسازی بیشتر رادیکال‌های آزاد در داخل سلول می‌شوند و سمیت شدیدتری برای سلول‌های باکتریایی ایجاد می‌کنند. همچنین چوی و همکاران (۱۵) با بررسی تاثیر AgNPs بر باکتری *E. coli* گزارش کردند که AgNPs علاوه بر اثرات یون نقره با چسبیدن به غشا باکتری سبب ایجاد حفراتی در آن می‌شود. تحت تاثیر این حفرات محتویات سلول به بیرون نشت می‌کند و سلول باکتری از بین می‌رود. در نتیجه حذف گونه‌های حساس با توجه به دلایل ذکر شده در روز شصت و سوم آزمایش جمعیت باکتریایی خاک به مقدار قابل توجهی کاهش یافت. این کاهش جمعیت قطعا با تغییر ترکیب جامعه میکروبی نیز همراه بوده است؛ که خود گواهی از تاثیر منفی نقره به هردو شکل یونی و نانو بر اکوسیستم خاک می‌باشد.

انها گزارش کردند که در پایان روز چهل و دوم در غلظت ۳۴۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم AgNPs تنوع جامعه میکروبی به شدت کاهش یافت و ۷۲ درصد از جمعیت باکتری‌های خاک را گونه *Rhodanobacter sp.* تشکیل داد. یانگ و همکاران (۵۸) اثر غلظت‌های مختلف AgNPs و  $AgNO_3$  را بر جمعیت باکتری‌های نیتروبیفیکاتور در لجن فاضلاب با استفاده از روش qPCR مطالعه کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که هر دو شکل نقره سبب کاهش فراوانی جمعیت باکتری‌های نیتروبیفیکاتور در لجن فاضلاب شدند اما  $AgNO_3$  نسبت به AgNPs تاثیر بازدارنده بیشتری داشت.  $AgNO_3$  و  $Ag^+$  با ایجاد تنش اکسیداتیو، اختلال در سنتز ATP، DNA و همچنین تغییر در نفوذپذیری غشا و نشت محتویات سلول به بیرون سبب تخریب سلول‌های باکتریایی می‌شوند (۲۸). مطالعات نشان داده است که سلول باکتری تحت تاثیر غلظت‌های میلی‌مولار  $Ag^+$  دچار تغییرات مورفولوژیکی می‌شود. در نتیجه این تغییرات سیتوپلاسم کوچک می‌شود و از دیواره سلولی فاصله می‌گیرد دیواره سلولی تخریب می‌شود و محتویات سلول به بیرون نشت می‌کند. تحت تاثیر این تغییرات سلول‌های باکتریایی وارد یک مرحله فعال می‌شوند که با



شکل ۸- میانگین درصد غلظت نسبی قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک در تیمارهای مختلف AgNPs و  $AgNO_3$  (مقادیر حاصل از میانگین ۳ عدد هستند). میانگین‌ها با حروف غیرمشابه دارای تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

Figure 7- Mean Percentage of relative concentration of soil bacterial 16S rDNA fragments in different treatments of AgNPs and  $AgNO_3$

(Values obtained from the average are 3). The means with dissimilar letters have a significant difference at the level of 5% probability.

## نتیجه گیری

دهیدروژناز و تنفس برانگیخته میکروبی خاک کاهش پیدا کرد در حالی که در فعالیت آنزیم اوره‌آز و جمعیت باکتری‌های هتروتروف افزایش مشاهده شد. شاخص زیستی کیفیت خاک با گذشت زمان در غلظت‌های ۱۰ و کمتر از آن کاهش و در غلظت‌های بیشتر افزایش یافت. به نظر می‌رسد با توجه به دسترسی زیستی بیشتر  $AgNO_3$  به طور کلی می‌توان گفت که تبدیل نقره به شکل نانو و جامد آن موجب کاهش سمیت نقره بر فعالیت و جمعیت میکروبی خاک مورد مطالعه شد. با این وجود AgNPs به عنوان یک آلاینده نوظهور همچنان پتانسیل سمیت بالایی برای جامعه میکروبی خاک دارد و می‌تواند سبب تغییر در جمعیت نسبی و کارکرد جامعه میکروبی خاک شود.

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت نقره در هر دو شکل مورد بررسی فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز و اوره‌آز، تنفس برانگیخته میکروبی، شاخص زیستی کیفیت خاک و غلظت نسبی قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک کاهش یافت. ترکیب  $AgNO_3$  نسبت به AgNPs اثر بازدارندگی بیشتری بر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، اوره‌آز، تنفس میکروبی برانگیخته خاک و شاخص زیستی کیفیت خاک داشت. با این حال بین شکل یونی و نانو نقره از لحاظ درصد غلظت نسبی قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. با گذشت زمان تحت تأثیر نقره فعالیت آنزیم

## منابع

- 1- Ahamed M., Posgai R., Gorey T.J., Nielsen M., Hussain S.M., and Rowe J.J. 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 242: 263-269.
- 2- Anderson J., and Domsch K. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10: 215-221.
- 3- Anjum N.A., Gill S.S., Duarte A.C., Pereira E., and Ahmad I. 2013. Silver nanoparticles in soil-plant systems. *Journal of Nanoparticle Research* 15: 1896.
- 4- Antisari L.V., Carbone S., Gatti A., Ferrando S., Nacucchi M., De Pascalis F., Gambardella C., Badalucco L., and Laudicina V.A. 2016. Effect of cobalt and silver nanoparticles and ions on *Lumbricus rubellus* health and on microbial community of earthworm faeces and soil. *Applied Soil Ecology* 108: 62-71.
- 5- Arora S., Jain J., Rajwade J., and Paknikar K. 2009. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 236: 310-318.
- 6- Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., and Hofmann M.C. 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences* 88: 412-419.
- 7- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., and Shipley G.L. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55: 611-622.
- 8- Butterman W., and Hilliard H. 2004. Mineral commodity profiles. Selenium. *Rapport US Department of the Interior US Geological Survey* 1-20.
- 9- Buzea C., Pacheco I.I., and Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2: MR17-MR71.
- 10- Cao C., Huang J., Cai W.-S., Yan C.-N., Liu J.-L. and Jiang Y.-D. 2017. Effects of silver nanoparticles on soil enzyme activity of different wetland plant soil systems. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 26: 558-567.
- 11- Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M., K. Braydich-Stolle L., Hess K.L., Jones R.L., and Schlager J.J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of physical chemistry B*, 112: 13608-13619.
- 12- Charley R.C., and Bull A.T. 1979. Bioaccumulation of silver by a multispecies community of bacteria. *Archives of Microbiology*, 123: 239-244.
- 13- Chandra, K., Salman, A. S., Mohd, A., Sweet, R. and Ali, K. N. 2015. Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and In vitro anti-arthritis potential of *costus speciosus* rhizome extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 7: 383-9.
- 14- Cho K.-H., Park J.-E., Osaka T., and Park S.-G. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta* 51: 956-960.
- 15- Choi O., Deng K.K., Kim N.-J., Ross Jr L., Surampalli R.Y., and Hu Z. 2008. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research* 42: 3066-3074.
- 16- Cornfield A. 1977. Effects of addition of 12 metals on carbon dioxide release during incubation of an acid sandy soil. *Geoderma* 19: 199-203.
- 17- Doolette C.L., McLaughlin M.J., Kirby J.K., Batstone D.J., Harris H.H., Ge H., and Cornelis G. 2013.

- Transformation of PVP coated silver nanoparticles in a simulated wastewater treatment process and the effect on microbial communities. *Chemistry Central Journal* 7: 46.
- 18- Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., and Galdiero M. 2015. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* 20: 8856-8874.
  - 19- Furno F., Morley K.S., Wong B., Sharp B.L., Arnold P.L., Howdle S.M., Bayston R., Brown P.D., Winship P.D., and Reid H.J. 2004. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 1019-1024.
  - 20- Giller K.E., Witter E., and Mcgrath S.P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1389-1414.
  - 21- Hänsch M., and Emmerling C. 2010. Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173: 554-558.
  - 22- Holden P.A., Klaessig F., Turco R.F., Priester J.H., Rico C.M., Avila-Arias H., Mortimer M., Pacpaco K., and Gardea-Torresdey J.L. 2014. Evaluation of exposure concentrations used in assessing manufactured nanomaterial environmental hazards: are they relevant? *Environmental Science & Technology* 48: 10541-10551.
  - 23- Hosseini S.S., Lakzian A., Halajnia A., and Hammami H. 2018. The Effect of olive husk extract compared to the EDTA on Pb availability and some chemical and biological properties in a Pb-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 20: 643-649.
  - 24- Jung R., Kim Y., Kim H.-S., and Jin H.-J. 2009. Antimicrobial properties of hydrated cellulose membranes with silver nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 20: 311-32.
  - 25- Levard C., Hotze E.M., Lowry G.V., and Brown Jr G.E. 2012. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental Science & Technology* 46: 6900-6914.
  - 26- Lok C.-N., Ho C.-M., Chen R., He Q.-Y., Yu W.-Y., Sun H., Tam P.K.-H., Chiu J.-F., and Che C.-M. 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research* 5: 916-924.
  - 27- Lubick N. 2008. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both?: ACS Publications.
  - 28- Marambio-Jones C., and Hoek E.M. 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* 12: 1531-1551.
  - 29- McShan D., Ray P.C., and Yu H. 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
  - 30- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T., and Yacaman M.J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16: 2346.
  - 31- Moreno B., Nogales R., Macci C., Masciandaro G., and Benitez E. 2011. Microbial eco-physiological profiles to estimate the biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil. *Ecological Indicators* 11: 1563-1571.
  - 32- Murata T., Kanao-Koshikawa M., and Takamatsu T. 2005. Effects of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipid fatty acid profiles of soil microbial communities. *Water, Air, and Soil Pollution* 164: 103-118.
  - 33- Neto M., Ohannessian A., Delolme C., and Bedell J.-P. 2007. Towards an Optimized Protocol for Measuring Global Dehydrogenase Activity in Storm-Water Sediments (10 pp). *Journal of Soils and Sediments* 7: 101-110.
  - 34- Nielsen M.N., Winding A., and Binnerup S. 2002. Microorganisms as indicators of soil health.
  - 35- Oliveira A., and Pampulha M.E. 2006. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102: 157-161.
  - 36- Panáček A., Kvítek L., Směkalová M., Večeřová R., Kolář M., Röderová M., Dyčka F., Šebela M., Pucek R., and Tomanec O. 2018. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology* 13: 65-71.
  - 37- Paulson K.N., and Kurtz L. 1969. Locus of Urease Activity in Soil 1. *Soil Science Society of America Journal* 33: 897-901.
  - 38- Paz-Ferreiro J., and Fu S. 2016. Biological indices for soil quality evaluation: perspectives and limitations. *Land Degradation & Development* 27: 14-25.
  - 39- Peyrot C., Wilkinson K.J., Desrosiers M., and Sauvé S. 2014. Effects of silver nanoparticles on soil enzyme activities with and without added organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 115-125.
  - 40- Rahmatpour S., Shirvani M., Mosaddeghi M.R., Nourbakhsh F., and Bazarganipour M. 2017. Dose–response effects of silver nanoparticles and silver nitrate on microbial and enzyme activities in calcareous soils. *Geoderma* 285: 313-322.
  - 41- Rahmatpour S., Mosaddeghi M.R., Shirvani M., and Šimůnek J. 2018. Transport of silver nanoparticles in intact columns of calcareous soils: The role of flow conditions and soil texture. *Geoderma* 322: 89-100.
  - 42- Reidy B., Haase A., Luch A., Dawson K., and Lynch I. 2013. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials* 6: 2295-2350.
  - 43- Rico C.M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., and Gardea-Torresdey J.L. 2011. Interaction of

- nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 3485-3498.
- 44- Roh J.-y., Sim S.J., Yi J., Park K., Chung K.H., Ryu D.-y., and Choi J. 2009. Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. *Environmental Science & Technology* 43: 3933-3940.
- 45- Samarajeewa A., Velicogna J., Princz J., Subasinghe R., Scroggins R., and Beaudette L. 2017. Effect of silver nanoparticles on soil microbial growth, activity and community diversity in a sandy loam soil. *Environmental Pollution* 220: 504-513.
- 46- Schlich K., and Hund-Rinke K. 2015. Influence of soil properties on the effect of silver nanomaterials on microbial activity in five soils. *Environmental Pollution* 196: 321-330.
- 47- Shin Y.-J., Kwak J.I., and An Y.-J. 2012. Evidence for the inhibitory effects of silver nanoparticles on the activities of soil exoenzymes. *Chemosphere* 88: 524-529.
- 48- Siripattanakul-Ratpukdi S., and Fürhacker M. 2014. issues of silver nanoparticles in engineered environmental treatment systems. *Water, Air, & Soil Pollution* 225: 1939.
- 49- Tabatabai M. 1977. Effects of trace elements on urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 9: 9-13.
- 50- Tabatabai M., and Bremner J. 1972. Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 4: 479-487.
- 51- Tabatabai M.A. 1982. Soil enzymes. *Methods of Soil Analysis, Part 2. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, In: Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R. (eds.)*
- 52- Thalmann A. 1966. The determination of the dehydrogenase activity in soil by means of TTC (triphenyltetrazolium). *Soil Biology* 6: 46-49.
- 53- van der Ploeg M.J., Handy R.D., Waalewijn-Kool P.L., van den Berg J.H., Herrera Rivera Z.E., Bovenschen J., Molleman B., Baveco J.M., Tromp P., and Peters R.J. 2014. Effects of silver nanoparticles (NM-300K) on *Lumbricus rubellus* earthworms and particle characterization in relevant test matrices including soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 743-752.
- 54- Velicogna J.R., Ritchie E.E., Scroggins R.P., and Princz J.I. 2016. A comparison of the effects of silver nanoparticles and silver nitrate on a suite of soil dwelling organisms in two field soils. *Nanotoxicology* 10: 1144-1151.
- 55- Wigginton N.S., Titta A., Piccapietra F., Dobias J., Nesatyy V.J., Suter M.J., and Bernier-Latmani R. 2010. Binding of silver nanoparticles to bacterial proteins depends on surface modifications and inhibits enzymatic activity. *Environmental Science & Technology* 44: 2163-2186.
- 56- Wijnhoven S.W., Peijnenburg W.J., Herberts C.A., Hagens W.I., Oomen A.G., Heugens E.H., Roszek B., Bisschops J., Gosens I., and Van De Meent D. 2009. Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3: 109-138.
- 57- Xu Q., Hu J., Xie K., Yang H., Du K., and Shi G. 2010. Accumulation and acute toxicity of silver in *Potamogeton crispus* L. *Journal of Hazardous Materials* 173: 186-193.
- 58- Yang Y., Quensen J., Mathieu J., Wang Q., Wang J., Li M., Tiedje J.M., and Alvarez P.J. 2014. Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than Ag<sup>+</sup> on the microbial community structure of activated sludge. *Water Research* 48: 317-325.
- 59- Zhang Z., Qu Y., Li S., Feng K., Wang S., Cai W., Liang Y., Li H., Xu M., and Yin H. 2017. Soil bacterial quantification approaches coupling with relative abundances reflecting the changes of taxa. *Scientific Reports* 7: 1-11.
- 60- Zhou J., Bruns M.A., and Tiedje J.M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied Environment Microbiology* 62: 316-322.

## Effects of Silver Nanoparticles on Soil Microbial Activity and Bacterial Populations in a Calcareous Soil Using qPCR

S. Balandeh<sup>1</sup>- A. Lakzian<sup>2\*</sup>- A. Javadmanesh<sup>3</sup>

Received: 25-01-2021

Accepted: 19-04-2021

**Introduction:** Silver nanoparticles (AgNPs) have a broad spectrum of uses, therefore, AgNPs will be released from those products into many different ecosystems. In the last decades, AgNPs have received substantial attention due to their distinctive physical and chemical properties such as high thermal and electrical conductivity, chemical stability, catalytic activity and antimicrobial properties against microbes such as bacteria, fungi, and viruses. There are many parameters for assessment effect of toxicity due to AgNPs but soil microbial community is one of which considered being an important target for assessing the impact of manufactured nano-materials on the terrestrial environment. Toxicity of AgNPs is due to the physical interaction of AgNPs with microorganisms and the production of reactive oxygen species (ROS). Although as we have been known harmful effects of AgNPs on the soil bacterial community, but the most information about antimicrobial properties of AgNPs come from the routine lab instructions such as soil respiration, substrate induced respiration and microbial biomass and colony forming unite. So, the objective of this paper was to study the effects of silver nanoparticles on microbial activity using the routine lab instructions and compare with the obtained data from the molecular genetic techniques. In this paper, the quantitate population of soil bacterial was estimated using Real time qPCR with the MIQE guidelines.

**Materials and Methods:** In order to study the effect of silver nanoparticles on microbial activity and bacterial population in a calcareous soil, an experiment was conducted as a completely randomized design based on factorial arrangement with three replications. Experimental factors included silver slat forms (AgNPs and AgNO<sub>3</sub>), Ag concentrations (0, 0.5, 5, 10, 50, and 100 mg Ag kg<sup>-1</sup> dry soil) and incubation time (7 and 42 days). Soil samples (*Typic Haplicambids*) with clay loam texture and seven percent of calcium carbonate was collected from Research Field of Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Khorasan Razavi, Iran. The soil samples were amended with different concentrations of AgNPs and incubated at 25°C for 42 days. The water content of soil samples was adjusted at 70% WHC during the incubation time. After 7 and 42 days of incubation, the soil substrate-induced respiration (SIR), heterotrophic plate count (HPC), and soil urease and dehydrogenase activities were measured. Finally, based on the obtained data, the soil biological quality index was estimated using the soil biological parameters. In order to quantify the total bacterial population, DNA was extracted from soil samples and was estimated using the relative concentration of 16S rDNA gene by a quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), with a minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE) guidelines.

**Results and Discussion:** The results showed that with increasing the concentration of both AgNPs and AgNO<sub>3</sub>, the activity of dehydrogenase and urease in soil samples decreased during the incubation times. Microbial substrate induced respiration (SIR) and the total bacterial population in soil samples considerably declined at the end of experiment. Bacterial population in AgNPs treatments decreased compared to AgNO<sub>3</sub> treatments but the reduction was not statistically significant. Over time, soil dehydrogenase activity and soil SIR decreased in both AgNPs and AgNO<sub>3</sub> treatments, while soil urease activity and heterotrophic bacterial populations improved but again in heterotrophic bacterial populations was not statistically significant. The soil biological quality index was estimated from the soil biological data. AgNO<sub>3</sub> treatments reduced the soil biological quality index compared to AgNPs treatments. In other words, the results showed that AgNO<sub>3</sub> was more toxic to soil bacteria activity compared to AgNPs. The lowest soil urease and dehydrogenase enzyme activity and soil biological quality index were observed in the treatment of 100 mg kg<sup>-1</sup> dry soil AgNO<sub>3</sub> after 7 days of incubation. The application of 0.5, 5, 10, 50, and 100 mg Ag kg<sup>-1</sup> dry soil decreased relative soil bacterial population by 22%, 40%, 59%, 73%, and 82% in AgNO<sub>3</sub> treatment and 10%, 30%, 68%, 76%, and 86% in AgNO<sub>3</sub> treatment compared to control after 42 days of incubation,

1 and 2- Ph.D. Student and Professor Department of Soil Science, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, respectively.

(\*- Corresponding Author Email: lakzian@um.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad  
DOI: 10.22067/JSW.2021.67908.1004



respectively.

**Conclusion:** The results of this study showed that silver nanoparticles can negatively affect the enzymes involved in the nitrogen and carbon cycle. The AgNPs had less toxicity effect on the soil microbial activity compared to AgNO<sub>3</sub>. However, AgNPs was more toxic to soil bacteria populations compared to AgNO<sub>3</sub>. Different behavior AgNPs and AgNO<sub>3</sub> in calcareous soil needs more investigations but there is no doubt that AgNPs is as an emerging contaminant and it has high toxicity potential for soil microbial community.

**Keywords:** Bacterial population, Dehydrogenase, Silver nanoparticles, Urease, qPCR