علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و دوم، شماره هشت، آبان ماه ۹۹

تعیین شاخص ED_{50} در یک خاک آهکی آلوده‌شده با غلظت‌های مختلف نیکل

منصوره ملحان [۱]

سعید حجتی [*۲]

s.hojati@scu.ac.ir

نعیمه عنایتی ضمیر [۲]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۵ **تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲**

چکیده

زمینه و هدف: خصوصیات میکروبی خاک از جمله زیست‌توده میکروبی، تنفس میکروبی و معدنی شدن نیتروژن می‌توانند شاخص‌هایی برای نشان دادن تنش ناشی از آلودگی فلزات سنگین بر عملکرد و کیفیت خاک باشند. هدف از این تحقیق اندازه‌گیری فعالیت‌های میکروبی خاک، برای مشخص کردن اثرات سمی غلظت‌های مختلف نیکل بر کیفیت خاک و تعیین غلظت بازدارندگی ۵۰ درصد (ED_{50}) نیکل می‌باشد.

روش بررسی: این آزمایش در سال ۱۳۹۵ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام یافت. فاکتورهای آزمایشی شامل فلز نیکل در شش سطح (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و دو دوره انکوباسیون (۱۵ و ۶۰ روزه) بود. یک نمونه خاک با نمک کلرید نیکل به‌طور یکنواخت برای ایجاد غلظت‌های مختلف آلوده شد. پس از سپری شدن دوره انکوباسیون ۱۵ و ۶۰ روزه، تنفس میکروبی، کربن زیست‌توده میکروبی، جمعیت هتروتروف‌ها و ضریب متابولیک نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید و با توجه به نتایج به‌دست آمده مقدار ED_{50} خاک تعیین شد.

یافته ها: اثر متقابل سطوح نیکل و دوره انکوباسیون در سطح یک درصد بر تمام ویژگی‌های اندازه‌گیری شده به جز کربن زیست‌توده میکروبی و ضریب متابولیکی معنی‌دار بود. با گذشت زمان و افزایش غلظت نیکل، جمعیت باکتری‌های هتروتروف، تنفس و کربن زیست-توده میکروبی نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان دادند. کمترین مقدار تنفس میکروبی، کربن زیست‌توده میکروبی و جمعیت باکتری‌های هتروتروف در پایان دوره انکوباسیون ۶۰ روزه و در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، به‌ترتیب با کاهش ۷۷/۰۷، ۷۵/۷۲ و ۹۹/۹۹ درصد نسبت به تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. با افزایش زمان انکوباسیون، مقدار ED_{50} (میلی‌گرم بر کیلوگرم) نیکل در مورد تنفس میکروبی، کربن زیست‌توده میکروبی و جمعیت باکتری‌های هتروتروف افزایش یافت.

بحث و نتیجه گیری: بر پایه نتایج حاصل از این پژوهش آلودگی نیکل فعالیت‌های بیولوژیکی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهد و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل در خاک به‌عنوان غلظت آستانه نیکل در این خاک تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: جمعیت هتروتروف، دوز زیستی، ضریب متابولیک، نیکل.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، خوزستان، ایران.

۲- دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، خوزستان، ایران. [*](مسوول مکاتبات)

J. Env. Sci. Tech., Vol 22, No.8, October, 2020

Determination of ED_{50} in a Calcareous Soil Contaminated with Different Concentrations of Ni

Mansoureh Malhan [1]
Saeid Hojati[2*]
s.hojati@scu.ac.ir
Naimeh Enayatizamir[2]

Admission Date:September 24, 2018 Date Received: December 26, 2017

Abstract

Background and Objectives: Soil microbial properties such as biomass, microbial respiration and nitrogen mineralization can be used as indicators to show the stress caused by heavy metal pollution on soil quality. The aim of this study was the measurement soil microbial activity to evaluate the effect of soil Ni contamination on soil quality and determination of ecological dose 50 (ED50).

Method: This study was conducted as a factorial experiment in year 2016 based on a randomized completely design with three replications. The experiment factors including Ni concentration in six levels (0, 50, 100, 150, 300 and 600 mg Ni kg-1) and two incubation times (15 and 60 days). Soils sample was spiked uniformly with different concentrations of NiCl2. Microbial respiration, microbial biomass carbon, heterotrophic population and metabolic quotient were measured after incubation times of 15 and 60 days, then according to the results, ED50 was determined by using the dose-response curve.

Findings: Soil Nickel contamination on the indicator was significantly effective at $P<0.01$ level. Heterotrophic population, respiration and microbial carbon biomass decreased significantly ($P<0.01$) compared to control by increasing the Ni concentration and incubation times, whereas the increase of Ni concentration and incubation times were not significantly affected on metabolic quotient. The minimum amount of microbial respiration, microbial biomass carbon, and the heterotrophic population was observed at the end of incubation times and 600 mg Ni kg-1 with 77.07, 75.72 and 99.99% decrement compared to the control, respectively. ED50 value (mg/kg soil) of microbial respiration, microbial biomass carbon, and heterotroph population increased from 77.55, 78.63, 81.34 to 97.84, 111.04 and 84.67 respectively, with increased incubation time.

Discussion and Conclusion: The soil contaminated with Nickel acutely decreased the biological activity of soil and the ecological dose increased with increasing the incubation time, suggesting that toxicity of Ni to soil microbial activity was decreased with increased incubation time. Ni concentration of 100 mgNikg-1 soil can be considered as the critical range of Ni for soil quality at which negative effect was observed.

Keywords: Ecological Dose, Heterotrophic Population, Metabolic Quotient, Ni.

1- M.Sc. Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Khuzestan, Iran
2- Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Khuzestan, Iran.*(Corresponding Author)

مقدمه

یکی از معضلات موجود در محیط‌زیست حضور انواع آلاینده‌ها در خاک می‌باشد که در سال‌های اخیر با توجه به افزایش جمعیت، استخراج معادن، تولید محصولات مصنوعی، استفاده از آفت‌کش‌ها، رنگ‌ها، باتری‌ها، ضایعات صنعتی و استفاده از فاضلاب صنعتی افزایش یافته است (۱). در میان آلاینده‌ها می‌توان به فلزات سنگین اشاره نمود که اثرات زیان‌باری بر کیفیت خاک دارد. فلزات سنگین در غلظت بالا به‌عنوان عامل سمیت برای بیشتر میکروارگانیسم‌ها شناخته شده‌اند. آن‌ها روی رشد، تنوع، متابولیسم و مورفولوژی میکروارگانیسم‌های خاک تاثیر می‌گذارند و موجب کاهش فعالیت و جمعیت میکروبی خاک شده و تعادل محیط‌زیست را برهم می‌زنند (۲). میکروارگانیسم‌های خاک نقش مهمی را در حاصلخیزی خاک از طریق تجزیه مواد آلی و چرخه مواد مغذی ایفا می‌کنند (۳). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که انباشت فلزات سنگین در خاک اثرات سمی بر میکروارگانیسم‌های خاک دارد (۴) و ایجاد اختلال در تنوع، جمعیت و فعالیت‌های کلی جوامع میکروبی خاک می‌شود (۵، ۶). خاک‌های آلوده به فلزات سنگین تهدیدی جدی بر عملکردهای بیولوژیکی خاک بوده و فعالیت‌های میکروبی خاک به‌وسیله فلزات سنگین کاهش می‌یابد (۷). این در حالی است که، پاسخ میکروارگانیسم‌ها در خاک به فلزات سنگین متفاوت می‌باشد. یک فلز با غلظتی مشخص می‌تواند برای یک گونه خاص سمی بوده، در حالی‌که برای سایر گونه‌ها به‌عنوان عامل محرک رشد عمل کند (۸).

بسیاری از محققان فعالیت‌های میکروبی خاک را به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی کاهش کیفیت خاک توسط فلزات سنگین ذکر کرده‌اند (۹، ۱۰، ۱۱). خصوصیات میکروبی خاک از جمله زیست‌توده میکروبی، تنفس میکروبی، معدنی شدن نیتروژن، ساختار و تنوع جوامع میکروبی خاک می‌توانند شاخص‌هایی برای نشان دادن تنش ناشی از آلودگی فلزات سنگین بر عملکرد و کیفیت خاک باشند (۱۲).

مقدار سمیت ناشی از فلزات سنگین و یا دیگر آلودگی‌ها می‌تواند با اندازه‌گیری دوز زیستی تعیین شود، در سال‌های اخیر نیز تلاش برای ارزیابی مقادیر ED_{50} (غلظت فلزات سنگین که در آن، فعالیت‌های بیولوژیکی ۵۰ درصد کاهش می‌یابد) برای تعیین اثرات فلزات سنگین بر خواص میکروبی و بیوشیمیایی خاک صورت گرفته است (۱۳). تعدادی از نویسندگان (۱۴، ۱۵) تاثیر فلزات سنگین بر فعالیت‌های آنزیمی مختلف خاک را از طریق تعیین دوز زیستی (ED_{50}) تعیین نمودند. ژائو و همکاران (۱۴) در مطالعه‌ای تاثیر فلز سنگین را بر ساختار میکروبی و فعالیت آنزیم‌ها را با تعیین مقدار ED_{50} بررسی کردند. نتایج نشان داد که افزایش غلظت فلزات سنگین سرب و کادمیوم تاثیر منفی بر اندازه کل جمعیت باکتری‌ها و فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی و فعالیت آنزیمی دارد. آنزیم دهیدروژناز به‌عنوان حساس‌ترین آنزیم خاک بود، در حالی‌که افزایش غلظت سرب و کادمیوم تأثیر کمتری بر کاهش فعالیت اوره‌آز داشت. ژیاو و همکاران (۱۶) نیز در مطالعه‌ای اثر وانادیوم بر فعالیت‌های آنزیمی خاک، تنفس پایه، کربن زیست‌توده میکروبی و ساختار جامعه میکروبی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که وانادیوم فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز خاک، تنفس و کربن زیست‌توده میکروبی خاک را تحت تاثیر قرار می‌دهد، در حالی‌که فعالیت آنزیم اوره‌آز حساسیت کمتری نسبت به تنش ناشی از وانادیوم دارد. میانگین ED_{50} نیز با استفاده از یک مدل دوز - پاسخ محاسبه شد و مقادیر ED_{50} به‌دست آمده برای کاهش تنفس میکروبی و کاهش فعالیت آنزیم دهیدروژناز به ترتیب ۳۶۲ و ۴۱۷ میلی‌گرم وانادیوم در کیلوگرم خاک بود. تحقیق حاضر با هدف بررسی پیامدغلظت‌های مختلف آلودگی نیکل بر برخی شاخص‌های زیستی خاک و تعیین ED_{50} می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش در سال ۱۳۹۵ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل غلظت فلز نیکل در شش سطح (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و دو دوره انکوباسیون (۱۵ و ۶۰

روزه) بود. بدین منظور نمونه خاکی از اراضی مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید چمران اهواز از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری خاک تهیه و بعد از هوا خشک شدن، برخی خصوصیات آن شامل بافت خاک به روش هیدرومتری، هدایت الکتریکی و pH خاک به‌ترتیب در عصاره و سوسپانسیون ۱:۱ خاک به آب، ظرفیت تبادل کاتیونی به روش باور، مواد آلی به روش والکی و بلک، آهک به روش تیتراسیون و نیتروژن به روش کجلدال تعیین گردیدند (۱۷). برای آلوده‌سازی خاک به فلز نیکل، از نمک کلرید نیکل ($NiCl_2$) در غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک استفاده شد. سپس تمام نمونه‌ها در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس و رطوبت ۶۵ درصد ظرفیت زراعی (FC) به مدت ۶۰ روز نگه‌داری شدند. پس از دوره‌ی زمانی (۱۵ و ۶۰ روز)، به‌منظور بررسی حساسیت فعالیت‌های میکروبی خاک به سمیت فلز نیکل، جمعیت باکتری‌های هتروتروف، تنفس میکروبی، کربن زیست‌توده میکروبی خاک و مقدار شاخص ضریب متابولیکی اندازه‌گیری شد. برای تعیین جمعیت باکتری‌های هتروتروف از روش محتمل‌ترین تعداد (MPN) استفاده شد (۱۸). تنفس میکروبی پایه به روش جمع‌آوری دی‌اکسید کربن آزاد شده و تیتراسیون با اسیدکلریدریک تعیین گردید (۱۹). کربن زیست-توده میکروبی نیز با روش تدخین- انکوباسیون طبق روش پیشنهادی جنکینسون و پاوولسون (۲۰) اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی تاثیر تنش ناشی از آلودگی نیکل بر انرژی مورد نیاز میکروب‌های خاک، ضریب متابولیکی از نسبت تنفس میکروبی به کربن زیست‌توده میکروبی خاک بر حسب ($mg\ CO_2\text{-}C\ mg^{-1}\ MBC\ day^{-1}$) محاسبه شد (۲۱) در نهایت میزان ED_{50} با استفاده از نرم‌افزار Origin نسخه شماره ۱۵ محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه شماره ۹/۴ و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن ($p< ۰/۰۵$)و رسم نمودارها در محیط Origin نسخه شماره ۱۵ انجام شد.

نتایج و بحث

برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بررسی شده در جدول ۱ آمده است. بر این اساس، خاک مورد مطالعه خاکی با بافت سنگین، با ۱/۳۲ درصد ماده آلی است.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک.

Table 1. Some chemical and physical properties of soil.

ویژگی (Properties)	واحد (Unit)	مقدار (Value)
PH		۷/۸
EC	($dS\ m^{-1}$)	۲/۴۲
ظرفیت تبادل کاتیونی (Cation Exchange Capacity)	($Cmol.kg^{-1}$)	۱۳/۶۷
ماده آلی (Organic Matter)	(%)	۱/۳۲
نیتروژن (Nitrogen)	(%)	۰/۰۷
کربنات کلسیم (Calcium carbonate equivalent)	(%)	۴۵/۳۸

بر پایه نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) اثر متقابل تیمارها بر تنفس میکروبی خاک و جمعیت باکتری‌های هتروتروف در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در حالی-که سطوح آلودگی به نیکل، دوره انکوباسیون و اثر متقابل بین فاکتورهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری بر ضریب متابولیک نداشته است. اثر اصلی تیمارها بر کربن زیست‌توده میکروبی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

آزمون میانگین اثر سطوح مختلف نیکل و دوره انکوباسیون

(شکل ۱) نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) این دو تیمار بر مقدار تنفس میکروبی خاک است. تنفس میکروبی خاک ۱۵ روز پس از آلودگی، در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک کاهش یافت (به‌ترتیب ۱۵/۹۸ و ۴۹/۴۶ درصد نسبت به شاهد) و سپس در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک نسبت به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک افزایش یافت که این افزایش تنفس معنی‌دار نبود. به‌نظر می‌رسد می‌توان دلیل آن را چنین بیان کرد که نیکل در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم سبب شده است که برخی از ریزجانداران حساس از بین رفته و سایر ریزجانداران از بقایای آن‌ها به‌عنوان منبع غذایی مناسب استفاده کنند و در نتیجه این فعالیت، دی اکسید کربن بیشتری آزاد کنند (۲۲). با افزایش غلظت نیکل میزان تنفس کاهش یافت و در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک، به کمترین مقدار خود رسید (۵۷/۳۳ درصد کاهش نسبت به شاهد). با افزایش دوره انکوباسیون و با گذشت ۶۰ روز پس از آلودگی، تنفس میکروبی خاک با افزایش سطوح نیکل کاهش یافت، به‌طوری‌که در غلظت ۶۰۰ میلی گرم نیکل در کیلوگرم خاک با ۷۷/۰۷ درصد کاهش نسبت به شاهد، تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد (بدون نیکل) نشان داد. فلزات سنگین در خاک علاوه بر ایجاد سمیت برای گیاهان، بر ریزجانداران خاک نیز تاثیر دارند و باعث اختلال در فعالیت آن‌ها می‌شوند (۲۳). از آن‌جا که ریزجانداران به‌سرعت به این عوامل تنش‌زا پاسخ می‌دهند و فرآیندهای میکروبیولوژیکی خاک به‌صورت غیر مستقیم تحت تاثیر اثرات زیان‌بار فلزات سنگین قرار می‌گیرد، می‌توان از فعالیت‌های میکروبی به‌عنوان شاخص تعیین آلودگی خاک به فلزات سنگین استفاده کرد. تنفس یکی از مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیکی خاک است که توسط میکروارگانیسم‌های خاک صورت می‌گیرد. فلزات سنگین با ازبین بردن میکروارگانیسم‌های خاک و یا ایجاد کمپلکس با سوبسترا، موجب کاهش تنفس میکروبی و فعالیت‌های میکروبی خاک می‌شود (۲۴). کاهش تنفس میکروبی خاک بر اثر آلودگی فلزات سنگین با نتایج مطالعات دیگر پژوهشگران نیز همخوانی داشت (۲۵، ۲۶). پژوهشی توسط نواز و همکاران (۲۷) برای بررسی اثرات آلودگی روی، مس و کادمیوم بر روی خواص میکروبی خاک انجام شد، و کاهش تنفس میکروبی در خاک‌های آلوده گزارش شد. ژیاو و همکاران (۱۶) نیز در مطالعه خود کاهش تنفس میکروبی خاک را در خاک‌های آلوده به وانادیوم گزارش نمودند. رحمت‌پور و همکاران (۲۸) نیز در پژوهشی تاثیر نقره بر تنفس را مورد برررسی قرار داده و بیان نمودند که نقره در مقادیر بالا سبب کاهش تنفس می‌شود در حالی‌که مقادیر پایین نقره تاثیر معنی‌داری بر تنفس ندارد و حتی سبب تحریک تنفس می‌شود. نتایج این مطالعه نیز تاثیر منفی نیکل را بر تنفس میکروبی خاک نشان داد که ممکن است به‌دلیل از بین رفتن و تغییرات ساختار جمعیتی میکروارگانیسم‌های خاک و یا کاهش فعالیت‌های میکروبی به‌علت حضور نیکل در خاک باشد.

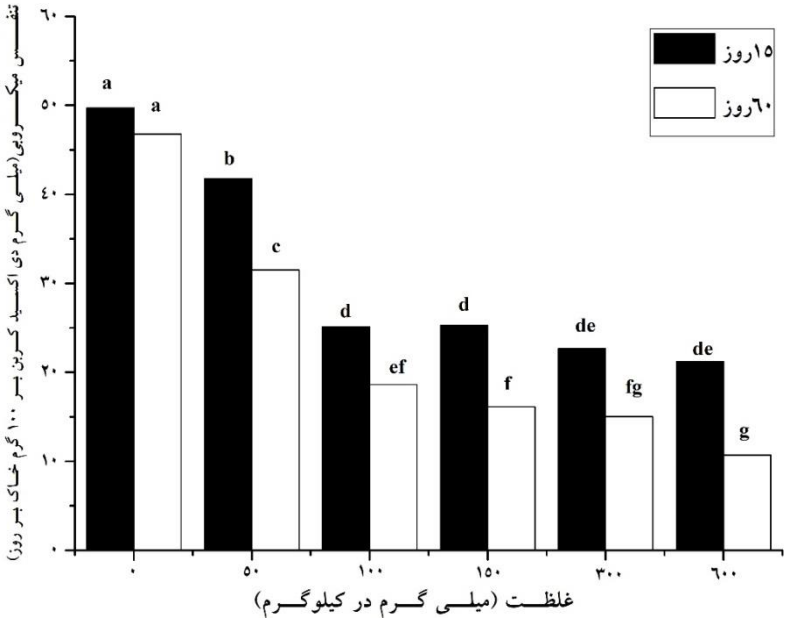
اثر ساده تیمارها بر کربن زیست‌توده میکروبی خاک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). شکل (۲) کربن زیست‌توده میکروبی را در سطوح مختلف نیکل و دو دوره زمانی (۱۵ و ۶۰ روز) نشان می‌دهد. در هر دو زمان انکوباسیون، بیشترین مقدار کربن زیست‌توده میکروبی در تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. کربن زیست‌توده میکروبی خاک ۱۵ روز پس از آلودگی، در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک کاهش یافت (به‌ترتیب ۲۳/۴۰ و ۵۶/۰۹ درصد نسبت به شاهد) و سپس در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک نسبت به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک افزایش یافت که این افزایش تنفس معنی‌دار نبود.

جدول ۲- تجزیه واریانس پیامد تیمارها بر شاخص‌های بیولوژیکی خاک.

Table 2. Analysis of variance of the treatments effect on biological indicators of soil

منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات			
		تنفس میکروبی	کربن بیومس میکروبی	ضریب متابولیک	جمعیت هتروتروف
سطوح آلودگی به نیکل	۵	۹۵۷/۷۴۲**	۴۰۱/۴۵۷**	۰/۰۳۱^{ns}	۵/۹۸۶۶۸×۱۰$^{+۱۴**}$
دوره انکوباسیون	۱	۵۵۱/۵۶۵**	۱۳۰/۰۴۸**	۰/۲۶۵^{ns}	۷/۲۱۷۳۹×۱۰$^{+۱۳**}$
سطوح نیکل × دوره انکوباسیون	۵	۱۲/۱۶۵**	۱/۸۳۲^{ns}	۰/۰۲۴^{ns}	۳/۱۵۱۴۴×۱۰$^{+۱۴**}$
خطای آزمایش	۲۴	۳/۳۱۱۵	۸/۴۶۳	۰/۰۸۳	۷۱۴۰۳۵۴/۸۰۹۹

** و ^{ns} = به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و عدم تفاوت معنی‌دار



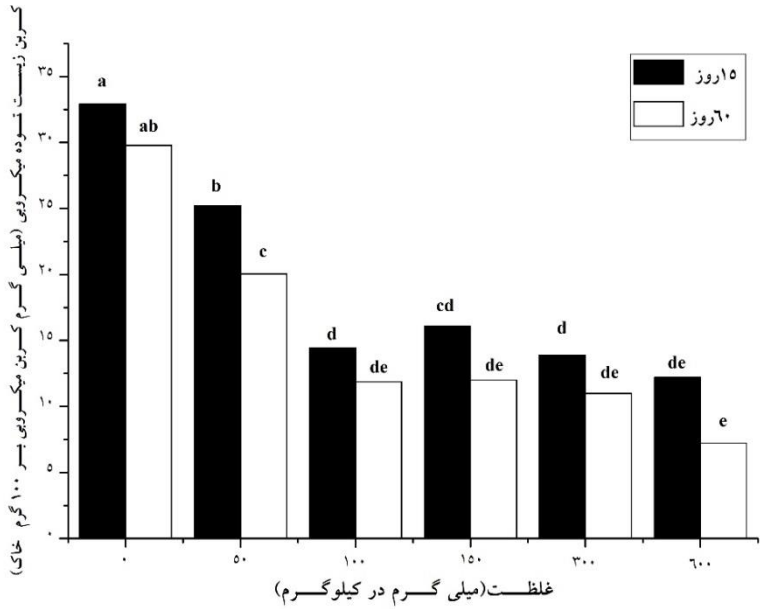
شکل۱- مقایسه میانگین تاثیر تیمارها بر تنفس میکروبی.

Figure 1. Mean comparison of the effects of treatments on microbial respiration

با افزایش غلظت نیکل میزان کربن زیست‌توده میکروبی کاهش یافت و در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک، به کمترین مقدار خود رسید (۶۲/۹۰ درصد کاهش نسبت به شاهد). با افزایش دوره انکوباسیون و با گذشت ۶۰ روز پس از آلودگی، کربن زیست‌توده میکروبی خاک با افزایش سطوح نیکل کاهش یافت، به‌طوری‌که در غلظت ۶۰۰ میلی گرم نیکل در کیلوگرم خاک با ۷۵/۷۲ درصد کاهش نسبت به شاهد، تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد (بدون نیکل) نشان داد. مطالعات نشان داده‌اند که زیست‌توده میکروبی خاک اغلب تحت تاثیر عمق خاک، نوسانات فصلی، آلودگی‌فلزات سنگین و شیوه‌های مدیریت زمین قرار دارد (۲۹). فلزات سنگین بر مورفولوژی، متابولیسم و رشد میکروارگانیسم‌ها در خاک تاثیر می‌گذارد زیرا آن‌ها یکپارچگی غشاهای سلولی را بهم می‌زنند. خان و همکاران (۹) با انجام پژوهشی نشان دادند که همبستگی معنی‌داری بین غلظت فلزات سنگین کادمیوم و سرب و مقدار کربن زیست‌توده میکروبی وجود دارد و مقدار کربن زیست‌توده میکروبی در خاک‌های آلوده مورد آزمون کاهش یافت. نتایج مشابهی توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است (۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷). در پژوهش‌های جداگانه اوبارد (۳۰)، کایزلکایای و همکاران (۳۱)، لیاو و زی (۳۲)، وانگ و

همکاران (۱۰) نشان دادند که زیست‌توده میکروبی و تنفس میکروبی خاک به فلزات سنگین بسیار حساس بوده و آثار زیان‌بار ناشی از فلزات سنگین را نشان می‌دهند.

تأثیر تیمارها بر شاخص ضریب متابولیکی (qCO_2) معنی‌دار نبود (جدول تجزیه واریانس) هر چند با افزایش غلظت نیکل در هر دو دوره زمانی، این شاخص افزایش یافت (شکل ۳). مقدار این شاخص در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک کمتر از آن در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم بود. بات (۳۳) در مطالعه خود متغیر بودن این شاخص در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین را گزارش نمود. برخی از پژوهشگران افزایش ضریب متابولیک (۳۲) و برخی دیگر کاهش ضریب متابولیک (۳۳) را با افزایش آلودگی خاک گزارش نموده‌اند.

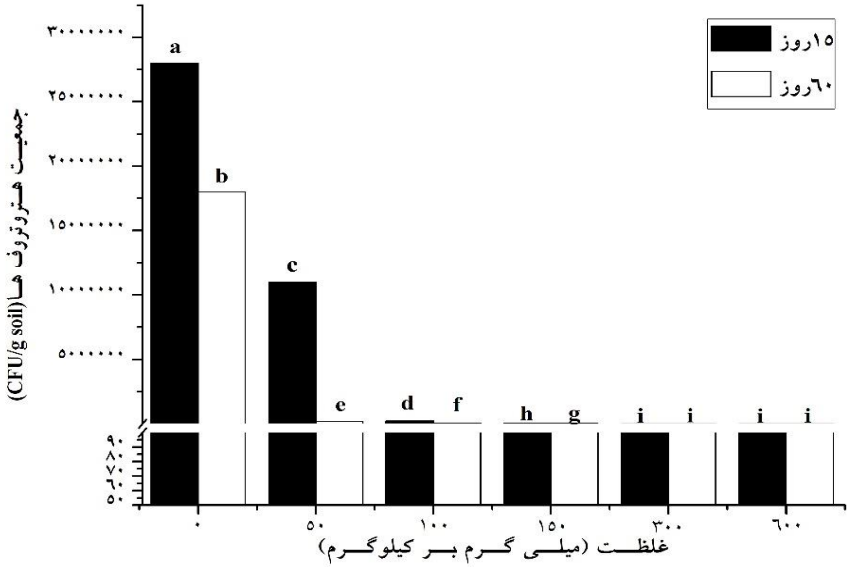


شکل۲- مقایسه میانگین تاثیر تیمارها بر کربن زیست‌توده میکروبی.

Figure 2. Mean comparison of the effects of treatments on microbial C biomass

آزمون میانگین اثر متقابل تیمارها بر جمعیت باکتری‌های هتروتروف در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (شکل ۳). بیشترین جمعیت باکتری‌های هتروتروف در تیمار شاهد در هر دو دوره زمانی اندازه‌گیری شد. با افزایش غلظت نیکل، جمعیت باکتری‌های هتروتروف در هر دو دوره انکوباسیون کاهش یافت. کمترین جمعیت باکتری‌های هتروتروف در غلظت ۶۰۰ میلی گرم نیکل در کیلوگرم خاک با کاهش ۹۹/۹۹ درصدی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. میکروارگانیسم‌های خاک به‌دلیل نقش آن‌ها در چرخه ترکیبات معدنی و نقش حیاتی در تجزیه مواد آلی، به‌عنوان یکی از اجزای مهم اکثر اکوسیستم‌های خاکی هستند (۳۴). تنش‌های زیست محیطی ناشی از فلزات سنگین به‌طور کلی تنوع و فعالیت جمعیت‌های میکروبی خاک را کاهش می‌دهد و تعادل جمعیت میکروارگانیسم‌های خاک را بر هم می‌زند. اثرات سمی فلزات سنگین به‌طور عمده ناشی از واکنش فلزات با آنزیم‌ها و ممانعت از فرآیندهای متابولیکی می‌باشد (۳۵). می‌توان گفت فلزات سنگین از طریق بازدارندگی عملکردهای سلولی باکتری‌ها که با متابولیسم انرژی مرتبط هستند، تقریبا برای تمام باکتری‌ها سمی می‌باشند (۳۶). در نتیجه، کاهش جمعیت‌های میکروبی در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین گزارش شده است (۳۷). فلزات سنگین به‌دلیل ماهیت خود، همانند مواد آلی در محیط پاکسازی نمی‌شوند و در محیط باقی مانده و جایگزین فلزات ضروری موجود در جایگاه‌های اتصال می‌شوند و به این ترتیب از طریق تخریب DNA، RNA، مهار سنتز پروتئین، ممانعت از

فرایندهای آنزیمی و تقسیم سلولی، به سلول و فرایندهای سلولی آسیب می‌رسانند و سبب کاهش جمعیت میکروبی در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌شود (۳۸). ژائو و همکاران (۱۴) در مطالعه خود تاثیر فلزات سنگین کادمیوم و سرب بر جمعیت میکروبی خاک مورد مطالعه قرار دادند. ایشان کاهش جمعیت باکتری‌های خاک را با افزایش تنش ناشی از سطوح فلزات سنگین دریافتند. همچنین ایشان بیان نمودند که باکتری‌ها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌های خاک به فلزات سنگین حساس‌تر می‌باشند.



شکل ۳- مقایسه میانگین تاثیر تیمارها بر جمعیت هتروتروف‌ها.

Figure 3. Mean comparison of the effects of treatments on heterotroph population

ED_{50} غلظتی از فلز است که باعث کاهش ۵۰ درصد جمعیت میکروارگانیسم یا فرآیندهای مورد نظر می‌شود و برای نشان دادن تاثیر فلزات سنگین بر فرآیندهای زیست‌محیطی و جمعیت میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌های مختلف استفاده می‌شود (۱۳). مقدار ED_{50} نیکل در جدول ۳ ارائه شده است. ضریب متابولیکی ۱۵ روز پس از آلودگی و کربن زیست‌توده میکروبی ۶۰ روز پس از آلودگی، به‌ترتیب با داشتن ۱۶۳/۷۰ و ۱۱۱/۰۴ میلی گرم بر کیلوگرم نیکل در خاک، بالاترین مقدار ED_{50} را نشان دادند. تنفس میکروبی ۱۵ روز پس از آلودگی با داشتن کمترین مقدار ED_{50} حساس‌ترین شاخص محسوب می‌شود. در تمامی شاخص‌ها به جز ضریب متابولیکی مقدار ED_{50} با افزایش دوره انکوباسیون افزایش یافته است که می‌تواند نشان‌دهنده کاهش اثر سمی نیکل باشد. مین و همکاران (۳۸) نیز در مطالعه خود نشان دادند با افزایش دوره انکوباسیون، مقدار ED_{50} نیز افزایش می‌یابد. قابلیت دسترسی فلزات سنگین پس از ورود به خاک و با طولانی شدن زمان انکوباسیون کاهش یافته در نتیجه سمیت آن‌ها نیز کاهش می‌یابد (۳۹).

جدول ۳-مقدار ED_{50} (میلی‌گرم نیکل در هر کیلوگرم خاک) شاخص‌های بیولوژیکی خاک توسط نیکل

Table 3. Values of ED_{50} (mg Ni/kg soil) of biological indicators of soil by Ni

ویژگی	زمان انکوباسیون	
	۱۵ روز	۶۰ روز
تنفس میکروبی	۷۷/۵۵	۹۷/۸۴
کربن زیست‌توده میکروبی	۷۸/۶۳	۱۱۱/۰۴
ضریب متابولیکی	۱۶۳/۷۰	۱۰۶/۴۳
جمعیت باکتری‌های هتروتروف	۸۱/۳۴	۸۴/۶۷

نتیجه‌گیری

در این پژوهش نتایج به‌دست آمده از بررسی تاثیر آلودگی نیکل بر کیفیت بیولوژیک خاک نشان داد که افزایش غلظت نیکل بر شاخص‌های میکروبی اندازه‌گیری شده (تنفس میکروبی، کربن زیست‌توده میکروبی خاک و جمعیت هتروتروف‌ها) اثر سمی و بازدارنده داشته و سبب کاهش شناسه‌های اندازه‌گیری شده، همچنین شناسه‌های اندازه‌گیری شده می‌توانند به‌عنوان شناسه‌های حساس میکروبی، برای بررسی پیامد زیان‌بار نیکل بر کیفیت خاک بررسی شده، معرفی شوند. مقادیر ED_{50} که سطح خاصی از بازدارندگی پارامترهای میکروبی خاک را نشان می‌دهد، می‌تواند برای تنظیم حداکثر غلظت بحرانی نیکل استفاده شود تا از اثرات غیر قابل برگشت عملکرد خاک جلوگیری شود، از آنجایی که مقدار ED_{50} با افزایش مدت زمان انکوباسیون تغییر کرده است، به نظر می‌رسد که انکوباسیون طولانی مدت برای تخمین مقدار ED_{50} یک خاک بهتر است، به‌طوری که جامعه میکروبی زمان کافی برای انطباق با شرایط تنش ناشی از آلودگی دارد. با توجه به مقادیر ED_{50} محاسبه شده برای شاخص‌های بیولوژیکی، به‌طور متوسط غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل در خاک، حد آستانه سمی نیکل در خاک می‌باشد.

Reference

1. Fang, F.M., Wang, Q.C., 2009. Research progress on mercury pollution in soil. Soil Environment; 9: 326 29.
2. Gasic, K., Korban, S.S., 2006. Heavy metal stress, in: K.V.M. Rao, A.S. Raghavendra, K.J. Reddy (Eds.), Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, pp. 219–254.
3. Avery S.V., 2001. Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. Advances in Applied Microbiology, 49: 111-142.
4. Pawlowska T., Charvat, I., 2004. Heavy-Metal Stress and Developmental Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Applied and Environmental Microbiology.70 : 6643-664
5. Šmejkalová M., Mikanová, O., Borůvka, L., 2003. Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms Plant Soil and Environment. 49: 321-326.
6. Kelly J.J., Haggblom, Max, M., R. L., 2003. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. Biology and Fertility of Soils, 38: 65-71.

7. Lee, J., Sun, K. 2014. Effects of chelates on soil microbial properties, plant growth and heavy metal accumulation. Ecological Engineering. 73: 386–39.
8. Stasinakis, A. S., Mamais, D., Thomaidis, N. S., and Lekkas, T. D. 2002. Effect of chromium on bacterial kinetics of heterotrophic biomass of activated sludge. Water Research. 36(13):3341–3349.
9. Khan, S., Hesham, H., Qiao, M., Rehman, Sh., and J. He. 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. Environmental Science and Pollution Research. 17:288–296.
10. Wang, Y.P., Shi, J.Y., Wang, H., Lin, Q., Chen, X.C., Chen, Y.X. 2007.The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter, Ecotoxicology and Environmental Safety. 67: 75–81.
11. Rajkumar, M., Freitas, H. 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of Ricinus communis in soil contaminated with heavy metals, Chemosphere, 71: 834–842.
12. Epelde, L., Becerril, J. M., Alkorta, I., Garbisu, C. 2009. Heavy metal phytoremediation: microbial indicatorsof soil health for the assessment of remediation efficiency, In A. Singh, R. C. Kuhad, and O. P. Ward (ed.).Advances in applied bioremediation, p. 299–313.
13. Speir, T.W., van Schaik, A.P., Hunter, L.C., Ryburn, J.L., Percival, H.J.2007. Attempts to derive EC50 values for heavy metals from land-applied Cu-, Ni-, and Zn-spiked sewage sludge. Soil Biology and Biochemistry, 39:539-549.
14. Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y.E., Shi, W.J. 2010. Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure: modified ecological dose–response model and PCR-RAPD. Environmental Earth Science 60:603–612.
15. Moreno. J.L., Landi, C., Garcı'a, L., Falchini, L., Pietramellara, G., Nannipieri, P. 2001. The ecological dose value (ED50) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. Soil Biology and Biochemistry 33:483–489.
16. Xiao, X.Y., Wang, M. W., Zhu, H.W., Guo, Z. H., Han, X.Q, Zeng, P. 2017. Response of soil microbial activities and microbial community structure to vanadium stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 142: 200-206.
17. Gupta PK, 2004. Soil, Plant, Water and Fertilizer Analysis. Agrobios (India), 438 p.
18. Cappucino, J. G., Sherman, N. 1999. Microbiology: a laboratory manual. Published by Benjamin-Cummings Pub Co. ISBN 10: 0805376461 ISBN 13: 9780805376463.
19. Anderson, J.P.E. 1982. Soil respiration. A.L. and R.H. Mille (Eds.), Methods of Soil Analysis Part 2, Chemical and Micro Biological Properties, American Society of Agronomy, Madison, WI. PP: 831-871.
20. Jenkinson, D. S. and D. S. Pawlson. 1976. The effect of biocidal treatments

on metabolism in soil. Fumigation with chloroform. Soil Biology and Biochemistry, 8: 167-177.

21. Cheng, W., Coleman, D.C., Carroll, C.R., and Hoffman, C.A. 1993. In situ measurements of root respiration and soluble carbon concentrations in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry. 25: 1189-1196.
22. Giller, K. E., Witter, E., McGrath, S. P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biology and Biogeochemistry. 30: 1389-1414.
23. Dai, J., Becquer, T., Rouiller, J.H., Reversat, G., Bernhard-Reversat, F., Nahmani, J., and Lavelle, P. 2004. Influence of heavy metals on C and N mineralization and microbial biomass in Zn, Pb, Cu and Cd contaminated soils. Appled Soil Ecology. 25: 99-109.
24. 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: 8-16.
25. Masto, R.E., Ahirwar, R., George, J., Ram, L.C., Selvi, V.A. 2011. Soil Biological and Biochemical Response to Cd Exposure. Journal of Soil Science. 1(1): 8-15.
26. Nwuche, C. O., Ugoji, E. O. 2008. Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity. International Journal of Environment Science Technique. 5(3): 409-414.
27. Nawaz, M., Wahid, A., Ahmad, S. S., Butt, A. 2015. Response of soil microbial biomass and respiration in heavymetal contaminated soil of Multan. International Journal of Biosciences. 7(4): 68-77.
28. Rahmatpour, S., Shirvani, M., Mosaddeghi, M. R., Nourbakhsh, F., Bazarganipour, M. 2017. Dose–response effects of silver nanoparticles and silver nitrate on microbial and enzyme activities in calcareous soils. Geoderma, 285: 313–322.
29. Calbrix, R., Barray, S., Chabrerie, O., Fourrie, L., Laval, K., 2007. Impact of organic amendments on the dynamics soil microbial biomass and bacterial communities in cultivated land. Applied Soil Ecology, 35: 511-522.
30. Obbard, P. 2001. Ecotoxicological assessment of heavy metals in sewage sludge amended soils. Applied Geochemistry. 16: 1405–1411.
31. Kizilkaya, R., Askin, T., Bayrakli, B. and Saglam, M., 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. European, Journal of Soil Biology. 40: 95-102.
32. Liao M., and Xie X.M. 2007. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaim wasteland of red soil area. Ecotoxicology and Environmental Safety, 66: 17-223.
33. Baath, E., Arnebrandt, K., Nordgren, A. 1991. Microbial biomass and ATP in smelter-polluted forest humus. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 47:278–282
34. Wardle, D. A., Ghani, A.1995. Why is the strength of relationships between pairs of methods for estimating soil

microbial biomass often so variable? Soil Biology and Biochemistry,27, 821–828.

35. Gasic, K., Korban, S.S. 2006. Heavy metal stress, in: K.V.M. Rao, A.S. Raghavendra, K.J. Reddy (Eds.), Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, pp. 219–254.
36. Lorenz, N., Hintemann, T., Kramarewa, T., Katayama, A., Yasuta, T., Marschner, P., Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B. 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. Environment International, 28:719–728.
37. Renella, G., Mench, M., Gelsomin, A., Landi, L., Nannipieri, P. 2005. Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. Soil Biology and Biochemistry, 37:1498–1506.
38. Min, L., Yun-Kuo, L., Xiao-Min, Z., Chang-Yong, H. 2005. Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in a paddy soil. Journal of Zhejiang University Science, 6(5):324-330.
39. Martinez, C.E., Jacobson, A.R., McBride, M.B., 2003. Aging and temperature effects on DOC and elemental release from a metal contaminated soil. Environmental Pollution, 122:135-143.