# اثر نانوهیدروکسی‌آپاتیت بر برخی شاخص‌های زیستی در یک خاک آهکی آلوده به کادمیم

زهره فرزانگان[۱]، علیرضا آستارایی[۲*]، امیر فتوت[۳]، امیر لکزیان[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۷)

**چکیده**

آزمایش حاضر با هدف بررسی تاثیر نانوهیدروکسی‌آپاتیت (nHAP) بر برخی شاخص‌های زیستی خاک و فراهمی کادمیم در یک خاک آهکی آلوده طراحی شد. این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل دو سطح کادمیم (صفر و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)، دو سطح nHAP (صفر و ۱ درصد وزنی خاک) و دو زمان انکوباسیون (۱۴ و ۲۸ روز) بودند. نمک کلرید کادمیم بصورت محلول در سطح خاک بطور یکنواخت پاشیده شد و یک ماه زمان تعادل به خاک داده شد، سپس nHAP در مقادیر صفر و یک درصد وزنی به خاک اضافه گردید. فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، دهیدروژناز و فسفاتاز قلیایی و همچنین تنفس پایه به همراه کادمیم زیست فراهم پس از ۱۴ و ۲۸ روز از اضافه شدن nHAP به خاک مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. کادمیم زیست فراهم در این آزمایش با عصاره‌گیر DTPA استخراج شد. نتایج نشان داد که کاربرد nHAP در خاک آلوده، کادمیم زیست فراهم را ۲/۳ درصد کاهش داد، فعالیت آنزیم اوره‌آز را ۹۸ درصد افزایش داد اما بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی، دهیدروژناز و تنفس پایه بی‌تاثیر بود. بررسی شاخص‌های زیستی در خاک آلوده در زمان‌های ۱۴و ۲۸ روز نشان داد که با گذشت زمان فعالیت آنزیم فسفاتاز روندی صعودی و فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و دهیدروژناز روندی نزولی داشت، اما فعالیت آنزیم فسفاتاز و میزان تنفس پایه تغییر معنی‌داری پیدا نکرد. همچنین در این مطالعه مشخص شد که گذشت زمان موجب کاهش ۱۰/۷ درصدی کادمیم زیست فراهم شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان داشت که nHAP بر شاخص‌های زیستی خاک اثری متفاوت داشت اما بر کادمیم زیست فراهم اثر کاهشی داشت اگرچه مقدار آن قابل ملاحظه نبود.

**واژه‌های کلیدی:** فعالیت آنزیمی، فلز سنگین، ماده اصلاحی، نانوذرات

فرزانگان ز.، آستارایی ع.ر. ، فتوت الف.، لکزیان الف. ۱۳۹۸. اثر نانوهیدروکسی‌آپاتیت بر برخی شاخص‌های زیستی در یک خاک آهکی آلوده به کادمیم. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۸، شماره ۲. صفحه:۲۲-۳۶.

۱- دانشجوی دکتری شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد (مکاتبه کننده)
۳- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
* پست الکترونیک: astaraei@um.ac.ir.

**مقدمه**

آلودگی خاک به فلزات سنگین به‌دلیل پیامدهای نامطلوب این فلزات بر سلامت محیط زیست و انسان، یک مشکل جدی محسوب شده (Wieczorek *et al*., 2018) و تبدیل به یک نگرانی جهانی شده است (He *et al*., 2013). در میان فلزات سنگین در مطالعات به کادمیم توجه ویژه‌ای شده است. زیرا این فلز از رایج‌ترین آلاینده‌های خاک می‌باشد که حتی در غلظت‌های بسیار کم سمیت زیادی برای موجودات زنده ایجاد می‌کند (Wu *et al*., 2015). از آن‌جا که فلزات سنگین برخلاف آلاینده‌های آلی تجزیه‌ناپذیر بوده و حذف آن‌ها از خاک نیز سخت و پر هزینه است (Ding *et al*., 2017)، تکنیک تثبیت فلزات سنگین یک روش پالایشی مناسب برای کاهش تحرک و فراهمی فلزات سنگین در خاک معرفی شده است. در تکنیک تثبیت فلز، به کمک ماده اصلاحی از طریق مکانیسم‌های جذب سطحی، کمپلکس شدن و یا رسوب از محلول خاک حذف می‌شود و برای انسان، گیاه و یا آب زیرزمینی غیر فراهم می‌شود (Kumpiene *et al*., 2006). هیدروکسی‌آپاتیت (HAP) با فرمول $Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$ که یک عضو از خانواده آپاتیت به شمار می‌آید به دلیل داشتن ظرفیت جذب زیاد از جمله مواد اصلاحی است که برای پالایش خاک و آب آلوده به فلزات سنگین مناسب شناخته شد (Chen *et al*., 2010). با گسترش نانوفناوری توجه پژوهشگران در پالایش خاک به استفاده از نانومواد به عنوان مواد اصلاحی معطوف شد. زیرا نانومواد واکنش‌پذیری و سطح ویژه بیشتری نسبت به همان مواد در اندازه غیرنانو دارند. به این ترتیب کاربرد HAP در امر پالایش خاک وارد مرحله جدیدی شد و آن استفاده از HAP در اندازه نانو بود. به عقیده پژوهشگران نانوهیدروکسی‌آپاتیت (nHAP) به‌دلیل ظرفیت زیاد در جذب فلزات سنگین، حلالیت کم در آب، پایداری زیاد در شرایط اکسیدی و احیایی و در دسترس بودن یک ماده ایده‌آل برای تثبیت فلزات سنگین است (He *et al*, 2013). اما با ورود نانومواد به محیط زیست نگرانی‌های بسیاری در مورد خطرات احتمالی آن‌ها بوجود آمد (El Hadri *et al*., 2017). مطالعه سمیت نانوذرات در زیست‌بوم‌های مختلف حاکی از آن است که نانوذرات به‌دلیل سطح ویژه زیاد و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردشان می‌توانند به‌طور بالقوه مضر باشند (Jiang *et al*., 2008). بازی و همکاران (Buzea *et al*., 2007) بیان نمودند کلید درک سمیت نانوذرات، اندازه کوچک آن‌ها است که به آن‌ها اجازه می‌دهد تا به ساختارهای زیستی نفوذ پیدا کنند و عملکرد اصلی را مختل کنند. رمیدیوس و همکاران (Remediuos *et al*., 2012) گزارش کردند که بعضی نانوذرات سمی نیستند و حتی می‌توانند پیامدهای مفیدی بر سلامتی ریزجانداران داشته باشند و بعضی دیگر برای ریزجانداران مختلف سمیت سلولی و حتی سمیت ژنی نشان داده‌اند. بنابراین توجه به اینکه نانومواد خود مسبب آلودگی محیط نشوند الزامی است. در خصوص HAP باید اذعان نمود که یک ترکیب زیست سازگار در خاک می‌باشد (Jiang *et al*., 2012) اما اینکه HAP در اندازه نانو با ریزجانداران خاک سازگاری دارد یا خیر، نیاز به بررسی دارد. به‌منظور درک پیامدهای زیست‌محیطی نانوذرات می‌توان به بررسی پیامدهای آن‌ها بر ویژگی‌های ریزجانداران خاک مانند کربن زیست توده میکروبی، تنفس پایه و نیز فعالیت‌های آنزیمی که شاخص‌های مناسبی برای تعیین اثر عوامل محیطی و تنش‌های وارده بر سلامت و کیفیت خاک می‌باشند، پرداخت (Usman *et al*., 2005; Ge *et al*., 2013). از جمله پژوهش‌های انجام شده در زمینه بررسی سمیت احتمالی نانوذرات بر ریزجانداران خاک با استفاده از شاخص‌های زیستی، می‌توان به مطالعه آنتیساری و همکاران (Antisari *et al*., 2013) اشاره نمود که با اندازه‌گیری کربن و نیتروژن زیست توده میکروبی به ارزیابی سمیت نانوذرات اکسید قلع ($SnO_2$)، مگنتیت ($Fe_3O_4$) و اکسید سریم ($CeO_2$) پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات تاثیر معنی‌داری بر میزان نیتروژن و کربن زیست توده میکروبی نداشتند.

با توجه به این مساله که هنوز در زمینه کارایی nHAP در پالایش خاک‌های آهکی آلوده و نیز پیامد زیست محیطی آن در محیط خاک در سطح دنیا و در ایران مطالعات چندانی صورت نگرفته و یا گزارشی منتشر نشده، هدف از انجام این پژوهش ارزیابی کارایی nHAP در کاهش آلودگی کادمیم و نیز بررسی سمیت nHAP بر زیست بوم یک خاک آهکی با استفاده از اندازه‌گیری شاخص‌های زیستی می باشد.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی اجرا شد. فاکتورهای این پژوهش شامل کادمیم در دو سطح صفر و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک ($Cd_0$ و $Cd_1$)، نانوهیدروکسی‌آپاتیت در دو سطح صفر و یک درصد وزنی ($nHAP_0$ و $nHAP_1$) و زمان اندازه‌گیری در دو بازه ۱۴و ۲۸ روز (14days و 28days) پس از شروع انکوباسیون خاک با nHAP (تهیه شده از شرکت ابزار پزشکی اسوه آسیا) بودند. خاک مورد مطالعه از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متری مزرعه دانشگاه فردوسی تهیه و پس از هوا خشک شدن و عبور از الک ۲ میلی متری، جهت اندازه‌گیری برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی به آزمایشگاه منتقل گردید. pH خاک در گل اشباع و قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع (Rhoades, 1982)، بافت خاک به روش هیدرومتری (Gee & Bauder, 1982)، کربن آلی خاک به روش والکلی و بلاک (Walkley & Black, 1934)، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی (Loeppert &Suares, 1996) و کادمیم کل با استفاده از هضم با اسید نیتریک ۴ مولار (Sposito, 1982) تعیین گردیدند. برای آلوده ساختن خاک، نمک کلرید کادمیم با غلظت ۴۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم خاک بصورت محلول و به‌طور یکنواخت در سطح خاک پاشیده شد و به منظور اینکه خاک با کادمیم اضافه شده به تعادل برسد، به مدت یک ماه در رطوبت ۷۰ درصد ظرفیت زراعی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت یک ماه، nHAP در مقادیر صفر و یک درصد وزنی به خاک اضافه گردید و خاک تیمار شده با در نظر گرفتن سه تکرار به ظروف ۵۰۰ گرمی دربدار (دارای منافذی جهت تبادل هوا) منتقل شد، نمونه‌های خاک به مدت یک ماه در رطوبت ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان‌های ۱۴ و ۲۸ روز پس از اضافه شدن nHAP، فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز قلیایی، دهیدروژناز و تنفس پایه و همچنین کادمیم زیست فراهم در نمونه‌های خاک اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز از روش تعیین آمونیم با روش تقطیر بخار (Tabatabai & Bremner, 1972)، فعالیت آنزیم دهیدروژناز از روش اصلاح شده تالمان (Thalmann, 1966) با اندازه‌گیری تغییر شکل سوبسترای ۵،۳، ۲-تری فنیل تترازولیوم کلراید به ۵، ۲-۱ تری فنیل فورمازان و فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی به روش رنگ-سنجی p- نیتروفنل (Tabatabai & Bremner, 1969) استفاده گردید. اندازه‌گیری تنفس پایه به روش ونس و همکاران (Vance et al, 1987)، مقدار کادمیم زیست فراهم با استفاده از عصاره‌گیر DTPA و روش لیندزی و نورول (Lindsay & Norvell, 1978) و غلظت کادمیم در عصاره‌ها با دستگاه جذب اتمی (مدل شیمادزو-۶۷۰) اندازه‌گیری شدند. تجزیه آماری داده‌ها با نرم افزار Minitab، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) فیشر در سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با برنامه Excel صورت گرفت.

## نتایج و بحث

جدول ۱ خصوصیات nHAP و جدول ۲ برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک پیش از آزمایش را نشان می‌دهد. طبق جدول ۱ نانوذرات HAP دارای خلوص بیشتر از ۹۹ درصد و میانگین اندازه ذرات برابر با ۲۲/۳۹ نانومتر می‌باشند. شکل ۱ تصویر nHAP را که با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تهیه شده است را نشان می‌دهد. بر اساس جدول ۲ خاک مورد مطالعه دارای بافت لوم سیلتی، غیر شور، pH در محدوده خنثی و آهک برابر ۱۳/۷۵ درصد می باشد. بر اساس استاندارد WHO (WHO, 1996) کادمیم خاک کمتر از حد مجاز (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) بوده و لذا خاک آلوده به کادمیم نبوده است.

**جدول۱- برخی ویژگی‌های نانوهیدروکسی‌آپاتیت**

Table 1. Some properties of nano hydroxyapatite

| Chemical Formula | Mean Size | Percentage Purity | pH | Ca/P molar ratio |
|---|---|---|---|---|
| $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ | 22.39 | 99.99 | 6.2 | 1.67 |

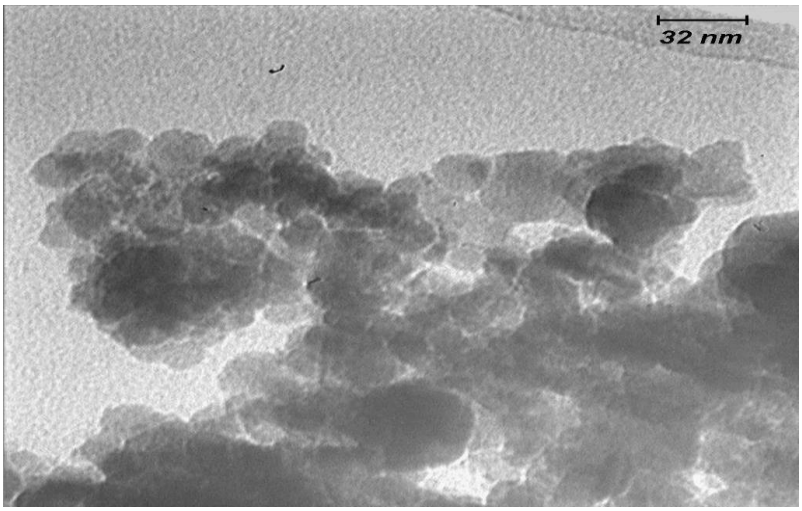
Ca/P molar ratio: نسبت مولی کلسیم به فسفر، pH : پی اچ، Percentage Purity: درصد خلوص، Mean Size: میانگین اندازه، Chemical Formula: فرمول شیمیایی .

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

Table 2. Some physical and chemical properties of studied soil

| Soil texture | pH | EC | Organic carbon | Calcium carbonate equivalent | Total cadmium |
|---|---|---|---|---|---|
| Silty Loam | 7.59 | 1.13 | 0.48 | 13.75 | 1.67 |

Total cadmium: کادمیوم کل، Calcium carbonate equivalent: کربنات کلسیم معادل،:Organic carbon: کربن آلی، EC: هدایت الکتریکی، Soil texture: بافت خاک.




**شکل ۱- تصویر TEM نانوهیدروکسی‌آپاتیت**

Figure 1.The TEM image of nano hydroxyapatite

**۱-اثر تیمارهای آزمایش بر کادمیم زیست فراهم**

طبق جدول ۳، اثر کادمیم و nHAP و نیز برهمکنش آن‌ها بر غلظت کادمیم زیست فراهم معنی‌دار شد. نتایج نشان داد که کاربرد nHAP در خاک غیر آلوده در غلظت کادمیم زیست فراهم تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد اما در خاک آلوده موجب کاهش ۲/۳ درصدی غلظت کادمیم زیست فراهم شد (شکل ۲). هی و همکاران (He *et al.*, 2013) و وی و همکاران (Wei *et al.*, 2016) کاهش کادمیم زیست فراهم توسط nHAP را گزارش کردند که با نتیجه این مطالعه هم‌خوانی دارد.

بررسی برهمکنش زمان و nHAP نشان داد که بیشترین غلظت کادمیم زیست فراهم در هفته دوم در عدم حضور nHAP و کمترین آن در هفته چهارم در حضور nHAP بود (شکل ۳-N). همچنین در حضور nHAP اثر زمان بر غلظت کادمیم زیست فراهم معنی‌دار نبود ولی در عدم حضور nHAP اثر زمان موجب ۱۹/۱۹ درصد کاهش معنی‌دار غلظت کادمیم زیست فراهم در زمان ۱۴ روز نسبت به ۲۸ روز شد. بطور کلی کاهش فراهمی کادمیم با گذشت زمان با توجه به وجود کربنات کلسیم در خاک مورد مطالعه امری دور از انتظار نبود. بررسی اثر متقابل زمان و کادمیم نیز نشان داد که در حضور کادمیم غلظت کادمیم زیست فراهم با گذشت زمان کاهش ۱۰/۷ درصدی داشت ولی در عدم حضور کادمیم غلظت کادمیم زیست فراهم تفاوت معنی‌داری در زمان‌های ۱۴ و ۲۸ روز نداشت (شکل ۳-C).

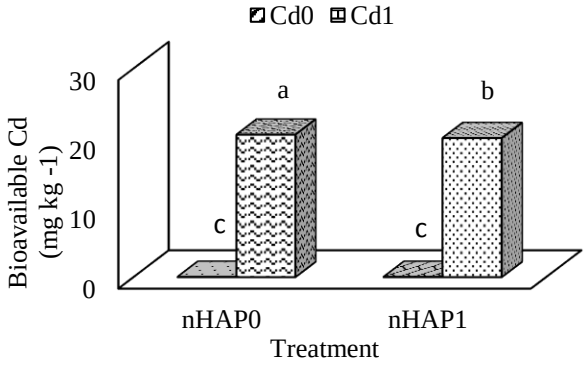
**جدول ۳- تجزیه واریانس اثر کادمیم و نانوهیدروکسی‌آپاتیت بر شاخص‌های زیستی و کادمیم زیست فراهم**

Table 3. Variance analysis of Cd and nano hydroxyapatite on bioindicators and bioavailable Cd

| Sources of variations | Degree of freedom | Urease enzyme | Phosphatase enzyme | Dehydrogenase enzyme | Respiration | Bioavailable Cd |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Time | 1 | 35498.6** | 9706** | 0.144587** | 0.00003ns | 7.75** |
| nHAP | 1 | 330.5** | 3988** | 0.029808** | 0.0009** | 0.36* |
| Cd | 1 | 4382.6** | 345165** | 0.017489** | 0.000098ns | 2448.81** |
| Time*nHAP | 1 | 59.5* | 8773** | 0.008999* | 0.000024ns | 6.52** |
| Time * Cd | 1 | 3869.1** | 22375** | 0.010362** | 0.000007ns | 7.96** |
| nHAP* Cd | 1 | 426.2** | 3208* | 0.000143ns | 0.000012ns | 0.35* |
| Time*nHAP*Cd | 1 | 62** | 209ns | 0.000007ns | 0.000253* | 6.48** |
| Error | 18 | 12.1 | 393 | 0.001225 | 0.000052 | 0.06 |
| Coefficient of variation | | 6.92 | 5.36 | 7.85 | 13.39 | 0.24 |

**، *و ns به ترتیب نشانه وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

*, ** and ns represent 1% and 5% levels of significance and no significant difference, respectively.




**شکل ۲- برهمکنش کادمیم و نانوهیدروکسی‌آپاتیت بر کادمیم زیست فراهم**

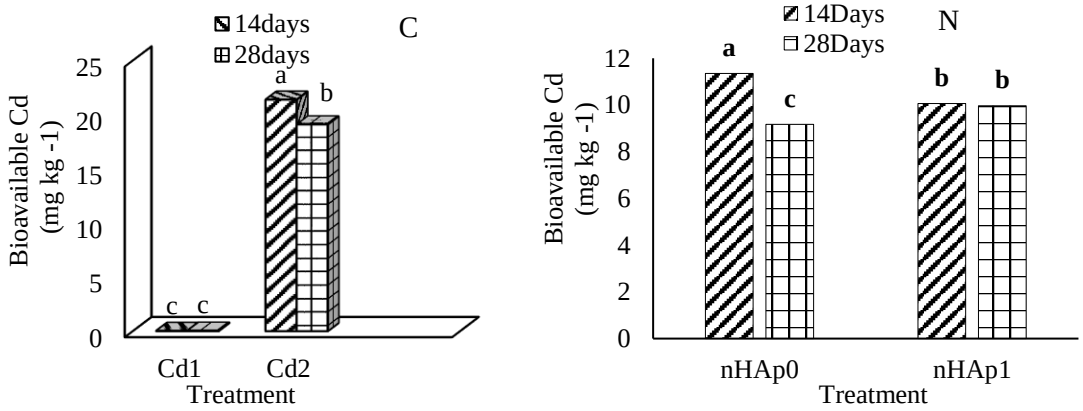
Figure 2. The Interaction of cadmium and nano hydroxyapatite on bioavailable cadmium

($nHAP_0$: بدون نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $nHAP_1$: با نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $Cd_0$: بدون کادمیم،$Cd_1$: با کادمیم).

($nHAP_0$: without nano hydroxyapatite, $nHAP_1$: with hydroxyapatite, $Cd_0$: with cadmium, $Cd_1$: with cadmium)

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری نیستند.

Means followed by the same subscript have not statistically significant difference ($P \leq 0.05$).




**شکل ۳-برهمکنش زمان با نانوهیدروکسی‌آپاتیت (N) و با کادمیم (C) بر کادمیم زیست فراهم**

Figure 3. The interaction of time and nano hydroxyapatite (N) and cadmium (C) on bioavailable cadmium

($nHAP_0$: بدون نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $nHAP_1$: با نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $Cd_0$: بدون کادمیم، $Cd_1$: با کادمیم).

($nHAP_0$: without nano hydroxyapatite, $nHAP_1$: with hydroxyapatite, $Cd_0$: with cadmium, $Cd_1$: with cadmium)

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری نیستند.

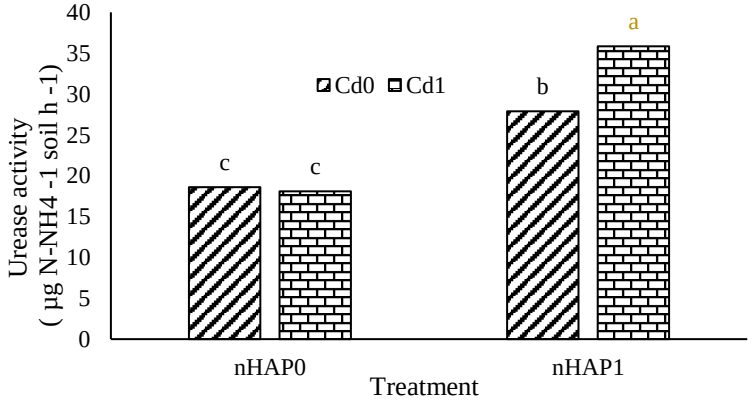
Means followed by the same subscript have not statistically significant difference ($P \leq 0.05$)

**۲-تاثیر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های زیستی**

**آنزیم اوره‌آز**

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس اثر متقابل کادمیم و nHAP بر فعالیت آنزیم اوره‌آز در سطح ۵ درصد معنی‌دار گردید (جدول ۳). بیشترین فعالیت آنزیم اوره‌آز مربوط به تیمار $Cd_1nHAP_1$ معادل با ۳۵/۸۲ و کمترین آن مربوط به تیمار $Cd_1nHAP_0$ معادل با ۱۸/۰۹ میلی‌گرم آمونیوم آزاد شده به ازای هر گرم خاک در هر ساعت انکوباسیون بود که با تیمار $Cd_0nHAP_0$ (۱۸/۶) تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم در هر سطح کادمیم در حضور nHAP بطور معنی‌داری بیشتر بود، به‌طوری‌که کاربرد nHAP در خاک آلوده موجب افزایش ۹۸ درصدی فعالیت آنزیم اوره‌آز نسبت به خاک شاهد گردید. کوی و همکاران (Cui *et al*., 2013) و وی و همکاران (Wei *et al*., 2016) در بررسی تاثیر کاربرد nHAP بر فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک به نتیجه مشابه با مطالعه حاضر دست یافتند. وی و همکاران (Wei *et al*., 2016) دلیل این رویداد را اثر nHAP بر کاهش مقدار فلزات قابل فراهم خاک، کاهش اثرات زیان آور فلزات سنگین بر فعالیت آنزیمی خاک و نیز اثر مثبت nHAP بر بهبود تنوع و ترکیب میکروبی خاک برشمردند. لیو و همکاران (Liu *et al*., 2018) نیز بیان داشتند که اثرات مثبت nHAP بر تنوع میکروبی ممکن است مربوط به تثبیت کادمیم باشد. افزون بر این، طبق یافته های کیم و همکاران (Kim *et al*., 2006) چون نانوذرات می‌توانند سطوح بزرگتری برای جذب آنزیم‌ها فراهم کنند، لذا بخشی از آنزیم‌های خاک روی سطوح nHAP تثبیت می‌شوند و تثبیت آنزیم‌ها روی سطوح سبب می‌شود که فعالیت بیشتری نسبت به آنزیم‌های آزاد داشته باشند. در این راستا مارزادوری و همکاران (Marzadori *et al*., 1998) در بررسی رفتار اوره آز جذب شده بر سطح HAP گزارش کردند که آنزیم جذب شده بر سطح HAP فعالیت بیشتری نسبت به آنزیم آزاد داشت. طبق شکل ۴ بیشترین مقدار فعالیت آنزیم اوره‌آز در حضور کادمیم بود. در رابطه با اثر آلودگی کادمیم بر فعالیت آنزیم اوره‌آز گزارش‌های متفاوتی ارائه شده است. بطوری‌که برخی پژوهشگران بین کادمیم و فعالیت آنزیم اوره‌آز رابطه مثبت (Baoshan *et al*., 2015) برخی رابطه منفی (Shi & Ma, 2017) و برخی هیچ رابطه معنی‌داری گزارش نکردند (Kandziora-Ciopara *et al*., 2016). بطور کلی بازدارندگی فعالیت آنزیم در اثر آلودگی فلزات سنگین در خاک یک مساله بسیار پیچیده است، زیرا فاکتورهای زیادی وجود دارند که اثر فلزات سنگین را بر فعالیت آنزیم‌های خاک تحت تاثیر قرار می‌دهند (Karaca *et al*., 2010). این فاکتورها می‌تواند به سه دسته اصلی شامل فلز، خاک و آنزیم تقسیم شود. ویژگی‌های فلز سنگین مانند نوع، غلظت، فراهمی و فرم شیمیایی فلز سنگین، ویژگی‌های خاک مانند pH، ماده آلی و مقدار رس، و نهایتا ویژگی‌های آنزیم مانند حساسیت آنزیم و بازدارندگی ساختار آنزیم در این امر تاثیر گذار هست (Yang *et al*., 2017). از جمله مطالعاتی که در آن‌ها بین کادمیم و فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک رابطه مثبت مشاهده شد، مطالعه کیزیلکایا و همکاران (Kizilkaya *et al*., 2004) بود که گزارش کردند که به استثنای فعالیت آنزیم اوره‌آز رابطه منفی معنی‌داری بین مقدار فلزات سنگین خاک و برخی شاخص های زیستی وجود داشت. آنها بیان نمودند که آنزیم خارج سلولی اوره‌آز به‌دلیل آن‌که محکم جذب سطحی رس و هوموس می‌شود، به آلودگی فلزات سنگین نسبت به سایر آنزیم‌ها مانند دهیدروژناز و کاتالاز مقاوم‌تر است. همچنین نتایج یانگ و همکاران (Yang *et al*., 2017) نشان داد که در میان غلظتهای کادمیم آستانه‌ای وجود دارد که در آن آستانه کادمیم می تواند موجب افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز و تجزیه میکروبی اوره گردد. بررسی فعالیت آنزیم اوره‌آز تحت تاثیر برهمکنش nHAP و زمان انکوباسیون نشان داد که گذشت زمان موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک بدون nHAP شد و در حضور nHAP فعالیت آنزیم تغییر معنی داری پیدا نکرد (شکل ۵-N). اما نتایج پژوهش کوی و همکاران (Cui *et al*., 2013) حاکی از آن بود که فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک آلوده و تیمار شده با nHAP در طی دوره ۶۰ روزه انکوباسیون، روند کاهشی داشت. این پژوهشگران علت روند نزولی فعالیت آنزیم را مطرح نکردند. در توضیح این مشاهدات می‌توان بیان داشت که پایداری و فعالیت آنزیم‌ها در خاک به عواملی همچون pH، فعالیت‌های میکروبی، آلاینده‌ها (Acosta-Martinez *et al*., 2007; Leinweber *et al*., 2008) و مواد افزوده شده به خاک (Patil *et al*., 2004) بستگی دارد. طبق شکل ۵-C فعالیت آنزیم اوره‌آز تحت

تاثیر برهم‌کنش کادمیم و زمان انکوباسیون روند کاهشی نشان داد. به‌طوری‌که در هر دو سطح کادمیم کمترین فعالیت آنزیم اوره‌آز در روز ۲۸ انکوباسیون مشاهده گردید. همانند نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، نتایج دوئلمن و هنسترا (Doelman & Hanstra, 1986) که تاثیر کادمیم را بر فعالیت آنزیم اوره‌آز در دو زمان ۶ هفته و ۱۸ ماه بررسی کردند، دلالت بر کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز با گذشت زمان داشت. نتایج مطالعه حسن و همکاران (Hassan *et al.*, 2013) نیز بیانگر کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک آلوده به کادمیم با گذشت زمان بود. آنها علت کاهش فعالیت آنزیم را افزایش سمیت کادمیم با گذشت زمان عنوان کردند. نتایج پژوهش شی و ما (Shi & Ma, 2017) که با نتایج این بخش از مطالعه حاضر مغایرت دارد، نشان داد که فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک آلوده به کادمیم با گذشت زمان افزایش یافت. آن‌ها علت افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز با گذر زمان را کاهش اثر سمیت کادمیم با گذشت زمان بیان کردند.




**شکل۴-برهمکنش کادمیم و نانوهیدروکسی‌آپاتیت بر فعالیت اوره‌آز**

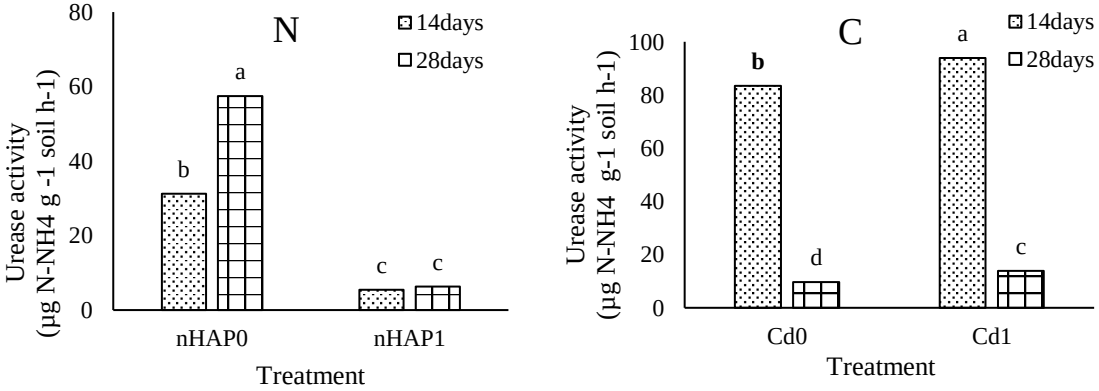
Figure 4.The interaction of cadmium and nano hydroxyapatite on urease activity.

($nHAP_0$: بدون نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $nHAP_1$: با نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $Cd_0$: بدون کادمیم، $Cd_1$: با کادمیم).

($nHAP_0$: without nano hydroxyapatite, $nHAP_1$: with hydroxyapatite, $Cd_0$: with cadmium, $Cd_1$: with cadmium).

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری نیستند.

Means followed by the same subscript have not statistically significant difference ($P \leq 0.05$)




**شکل۵- برهمکنش زمان با نانوهیدروکسی‌آپاتیت (N) و با کادمیم (C) بر فعالیت اوره‌آز**

Figure 5.The interaction of Time and nano hydroxyapatite (N) and cadmium (C) on urease activity

($nHAP_0$: بدون نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $nHAP_1$: با نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $Cd_0$: بدون کادمیم، $Cd_1$ : با کادمیم).

($nHAP_0$: without nano hydroxyapatite, $nHAP_1$: with hydroxyapatite, $Cd_0$: with cadmium, $Cd_1$: with cadmium)

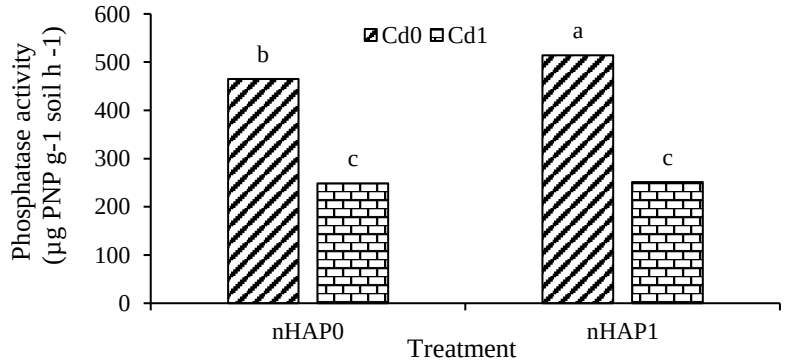
میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری نیستند.

Means followed by the same subscript have not statistically significant difference ($P \leq 0.05$).

**آنزیم فسفاتاز قلیایی**

مطابق جدول ۳ اثر برهمکنش کادمیم و nHAP بر فعالیت آنزیم فسفاتاز در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود، بطوری‌که بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به تیمار $Cd_0nHAP_1$ با مقدار ۵۱۴/۱۳ و کمترین فعالیت آنزیم مربوط به تیمار $Cd_1nHAP_0$ با مقدار ۲۴۸/۵۱ میکروگرم پارانیتروفنل بر گرم خاک خشک در یک ساعت بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم فسفاتاز در خاک بدون کادمیم در حضور nHAP به‌طور معنی‌داری بیشتر بود اما در حضور کادمیم تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۶). در مطالعه وی و همکاران (Wei *et al*., 2016) کاربرد nHAP به مقدار ۰/۱ درصد وزنی به خاک آلوده، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی را افزایش داد که متفاوت با نتیجه بدست آمده در این پژوهش است. میولر و ناواک (Mueller & Nowak., 2010) بیان داشتند که نانوذرات چون به لحاظ ترکیب، ساختار، وزن مولکولی، نقطه ذوب و جوش، حلالیت در آب، فعالیت، پتانسیل هماوری و پراکندگی و پوشش سطح ممکن است با یکدیگر تفاوت داشته باشند، لذا به لحاظ تاثیر در محیط زیست نیز رفتاری متفاوت خواهند داشت. در آزمایش کوی و همکاران (Cui *et al*., 2013) ویژگی‌های nHAP مورد مطالعه شامل pH معادل ۷/۱۴، اندازه ۴۰ نانومتر و نسبت مولی کلسیم به فسفر برابر با ۱/۷۲ بوده که با خصوصیات nHAP در مطالعه حاضر، متفاوت است (جدول ۱). بنابراین شاید دلیل اختلاف نتایج را بتوان به متفاوت بودن ویژگی‌های نانوذرات نسبت داد که بر محیط زیست تاثیر می‌گذارند. همان‌گونه که شکل ۶ نشان میدهد در هر سطح nHAP فعالیت آنزیم فسفاتاز در حضور کادمیم به‌طور معنی‌داری کمتر بود. کاهش فعالیت آنزیم فسفاتاز بر اثر آلودگی کادمیم در مطالعه حاضر مشابه با نتایجی است که به‌وسیله دیگر پژوهشگران گزارش شده است (Sethi & Gupta, 2015; Fan *et al*., 2018). یافته‌های پژوهشگران نشان می‌دهد که فلزات سنگین می‌توانند از طریق برهم‌کنش با کمپلکس سوبسترا-آنزیم، تغییر شکل آنزیم یا بلوکه‌کردن گروه‌های عاملی آنزیم‌ها، بازدارنده واکنش‌های آنزیمی شوند. فلزات سنگین همچنین می‌توانند سنتز آنزیم توسط سلول‌های میکروبی را تحت تاثیر قرار دهند. اثر غیر مستقیم فلزات سنگین نیز بر فعالیت آنزیم‌ها محتمل است بخاطر اینکه تغییرات در ساختار جامعه میکروبی می‌تواند فعالیت آنزیم را نیز تغییر دهد (Nannipieri, 1994). قابل ذکر است که می‌توان این مکانیسم‌ها را نیز در مورد فلز سنگین کادمیم محتمل دانست.

بررسی روند تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز تحت تاثیر برهم‌کنش nHAP و زمان انکوباسیون نشان داد که گذشت زمان بر فعالیت آنزیم در خاک تیمار نشده با nHAP تغییر معنی‌داری ایجاد نکرد اما سبب افزایش ۲۲/۸۴ درصدی فعالیت آنزیم در خاک تیمار شده با nHAP در زمان ۲۸ روز شد (شکل ۷-N). کوی و همکاران (Cui *et al*., 2013) با کاربرد nHAP در خاک آلوده به کادمیم در مورد آنزیم فسفاتاز اسیدی نتایجی مشابه با مطالعه حاضر بدست آوردند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی با گذشت زمان انکوباسیون افزایش یافت. بررسی اثر برهم‌کنش زمان و کادمیم بر فعالیت آنزیم نیز نشان داد که گذشت زمان بر فعالیت آنزیم در خاک آلوده به کادمیم تاثیر معنی‌داری نداشت اما در خاک بدون کادمیم سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گردید (شکل ۷-C). خان و همکاران (Khan *et al*., 2010) فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی را در زمان‌های صفر، ۲، ۹ و ۱۲ هفته پس از شروع انکوباسیون با کادمیم بررسی و گزارش کردند که کمترین فعالیت آنزیم در هفته دوم بود و پس از آن با گذشت زمان افزایش یافت که با نتایج این بخش از آزمایش مطابقت دارد. پژوهشگران علت امر را این چنین بیان کردند که ریزجانداران در ابتدا که به شکل ناگهانی در معرض کادمیم قرار می‌گیرند، فعالیت آنزیمی آن‌ها کاهش یافته اما پس از آن به سبب سازگار شدن ریزجانداران به آلودگی خاک، فعالیت آنزیم با گذشت زمان افزایش می‌یابد. بنابراین شاید بتوان افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز در این مطالعه را به این علت نسبت داد. مغایر با این نتیجه، حسن و همکاران (Hassan *et al*., 2013) که فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی را ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از اضافه کردن کادمیم در غلظت های صفر، ۵۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک اندازه‌گیری کردند، بیان نمودند که اثر سمیت کادمیم بر فعالیت آنزیم با گذشت زمان انکوباسیون افزایش یافت به‌طوری‌که کمترین فعالیت آنزیم فسفاتاز را در انتهای دوره انکوباسیون مشاهده نمودند.




**شکل ۶- برهمکنش کادمیم و نانوهیدروکسی‌آپاتیت بر فعالیت فسفاتاز قلیایی**

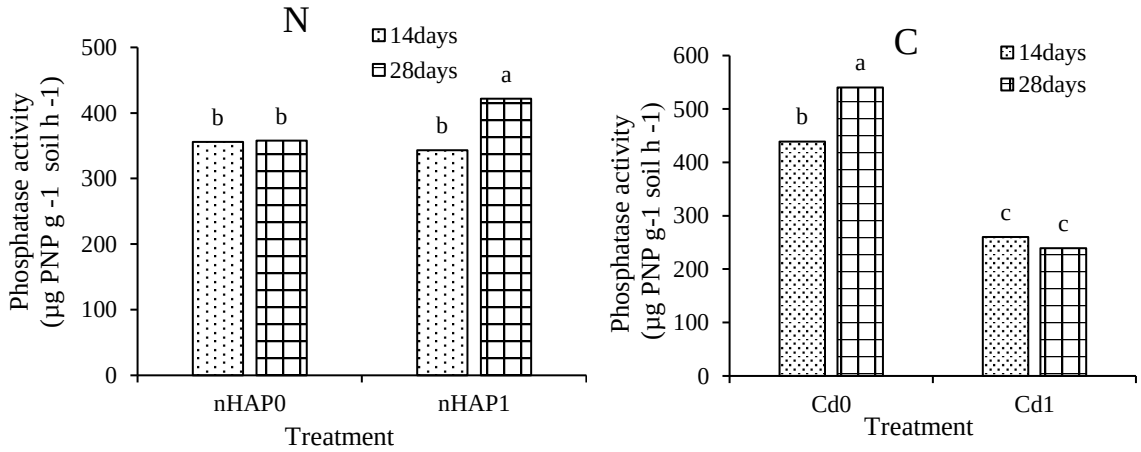
Figure 6**.** The interaction of Cd and nHAP on phosphatase activity

($nHAP_0$: بدون نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $nHAP_1$: با نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $Cd_0$: بدون کادمیم، $Cd_1$: با کادمیم).

($nHAP_0$: without nano hydroxyapatite, $nHAP_1$: with hydroxyapatite, $Cd_0$: with cadmium, $Cd_1$: with cadmium)

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری نیستند.

Means followed by the same subscript have not statistically significant difference ($P \leq 0.05$).




**شکل ۷- برهمکنش زمان با نانوهیدروکسی‌آپاتیت (N) و با کادمیم (C) بر فعالیت فسفاتاز**

Figure 7. The interaction of Time and nano hydroxyapatite (N) and Cd (C) on phosphatase activity

($nHAP_0$: بدون نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $nHAP_1$: با نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $Cd_0$: بدون کادمیم، $Cd_1$: با کادمیم).

($nHAP_0$: without nano hydroxyapatite, $nHAP_1$: with hydroxyapatite, $Cd_0$: with cadmium, $Cd_1$: with cadmium)

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری نیستند.

Means followed by the same subscript have not statistically significant difference ($P \leq 0.05$).

**آنزیم دهیدروژناز**

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس برهم‌کنش کادمیم و nHAP بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز معنی‌دار نبود ولی اثرات اصلی آن‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). به‌طوری‌که فعالیت آنزیم دهیدروژناز در حضور کادمیم و nHAP به‌ترتیب ۱۱/۴۳ و ۱۴/۶۶ درصد کمتر از عدم حضور آنها بود (جدول ۴). به این ترتیب بر اساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم دهیدروژناز نیز همانند آنزیم فسفاتاز قلیایی در اثر حضور کادمیم کاهش یافت. مشابه با نتایج این آزمایش، نتایج پژوهش وی و همکاران (Wei *et al*., 2016) نیز بیانگر حساسیت مشابه آنزیم دهیدروژناز و فسفاتاز قلیایی به آلودگی کادمیم بود. اثر بازدارنگی آلودگی کادمیم بر پتانسیل اکسیدکنندگی آنزیم دهیدروژناز با مشاهدات پژوهشگران مختلف (Xie *et al*., 2009) مشابهت داشت. مستو و همکاران (Masto *et al*., 2011) بیان نمودند که دلیل حساسیت زیاد آنزیم دهیدروژناز به آلودگی کادمیم این است که آنزیم دهیدروژناز یک آنزیم درون سلولی است که تنها در داخل سلول‌های زنده ریز جانداران فعال است

**جدول ۴- اثرات اصلی کادمیم و نانوهیدروکسی‌آپاتیت بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز** ($\mu g\ TPF\ g^{-1} soil\ h^{-1}$) **و تنفس پایه** ( $mg\ CO_2\ g^{-1}\ soil\ day^{-1}$).

Table 4. The main effect of cadmium and nano hydroxyapatite on dehydrogenase enzyme ($\mu g\ TPF\ g^{-1} soil\ h^{-1}$) and basal respiration ($mg\ CO_2\ g^{-1}\ soil\ day^{-1}$)

($nHAP_0$: بدون نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $nHAP_1$: با نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $Cd_0$: بدون کادمیم، $Cd_1$: با کادمیم).

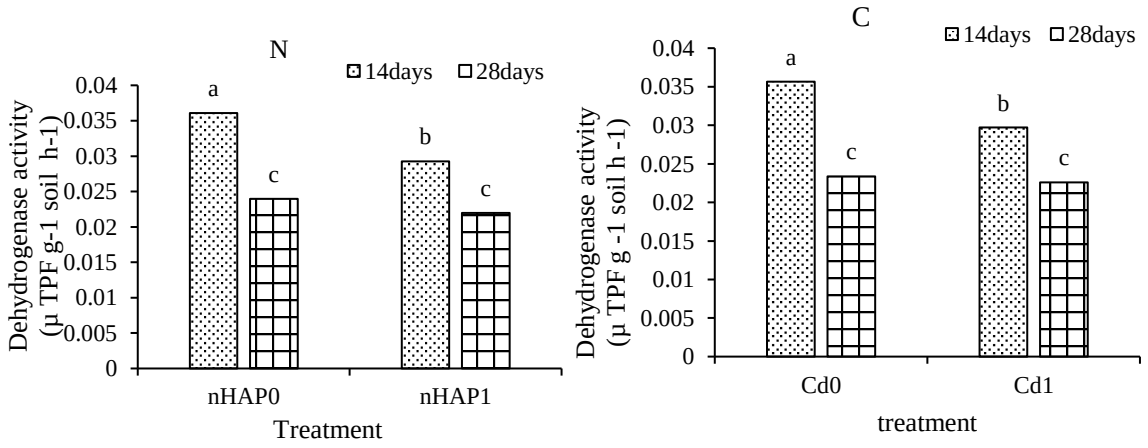
($nHAP_0$: without nano hydroxyapatite, $nHAP_1$: with hydroxyapatite, $Cd_0$: with cadmium, $Cd_1$: with cadmium)

| Treatment | Level | Dehydrogenase enzyme | Basal respiration |
|---|---|---|---|
| Cd | $Cd_0$ | $0.02^a$ | $0.04^b$ |
| | $Cd_1$ | $0.02^b$ | $0.05^a$ |
| nHAP | $nHAP_0$ | $0.03^a$ | $0.05^a$ |
| | $nHAP_1$ | $0.025^b$ | $0.04^a$ |

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری نیستند.

Means followed by the same subscript have not statistically significant difference ($P \leq 0.05$).

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم دهیدروژناز تحت تاثیر برهمکنش nHAP و کادمیم با زمان (شکل ۸-N و ۸-C) نشان داد که فعالیت آنزیم در هفته چهارم نسبت به هفته دوم انکوباسیون کاهش معنی‌داری داشت. روند کاهشی فعالیت آنزیم دهیدروژناز با گذشت زمان در خاک آلوده به کادمیم در نتایج برخی از پژوهشگران ( Vig *et al*., 2003; Masto *et al*., 2011; Hassan *et al*., 2013) نیز مشاهده شده است. حسن و همکاران ( Hassan *et al*., 2013) که بین سمیت کادمیم و گذشت زمان انکوباسیون رابطه مستقیمی مشاهده نمودند، علت کاهش فعالیت آنزیم دهیدروژناز را از بین رفتن ریزجانداران موثر در طی زمان انکوباسیون بیان نمودند. سردار و همکاران ( Sardar *et al*., 2007) کاهش فعالیت آنزیم دهیدروژناز را در هفته دوم به‌دلیل مواجهه ناگهانی ریزجانداران با کادمیم دانستند. علت کاهش فعالیت آنزیم دهیدروژناز در مطالعه حاضر را احتمالا می‌توان به عوامل ذکر شده نسبت داد.




**شکل ۸- برهمکنش زمان با نانوهیدروکسی‌آپاتیت (N) و با کادمیم (C) بر فعالیت دهیدروژناز**

Figure 8. The interaction of Time and nano hydroxyapatite (N) and Cd (C) on phosphatase activity

($nHAP_0$: بدون نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $nHAP_1$: با نانوهیدروکسی‌آپاتیت، $Cd_0$: بدون کادمیم، $Cd_1$: با کادمیم).

($nHAP_0$: without nano hydroxyapatite, $nHAP_1$: with hydroxyapatite, $Cd_0$: with cadmium, $Cd_1$: with cadmium)

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری نیستند.

Means followed by the same subscript have not statistically significant difference ($P \leq 0.05$).

نتایج این مطالعه نشان داد که اثر کاربرد nHAP بر فعالیت سه آنزیم متفاوت بوده، به نحوی که کاربرد nHAP در خاک آلوده موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز شد و بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی و آنزیم دهیدروژناز تاثیر معنی‌داری نداشت. به نظر می‌رسد دلیل این امر را می‌توان بر اساس یافته‌های کوی و همکاران (Cui *et al*., 2013) توضیح داد که بیان داشتند nHAP به دلیل دارا بودن ویژگی‌های خاص فیزیکی و شیمیایی ممکن است سبب اثرات متفاوتی بر فعالیت آنزیم‌های خاک شود. همچنین ما و همکاران (Ma *et al*., 2013) گزارش کردند که اثر زیستی نانوذرات به مقدار زیادی وابسته به گونه مورد آزمایش، تفاوت‌های نانوذرات (از قبیل غلظت، اندازه و حل‌پذیری نانوذرات) و روش‌های مورد آزمایش دارد.

**تنفس پایه**

نتایج نشان داد که nHAP و برهمکنش آن با کادمیم اثر معنی‌داری بر تنفس پایه نداشته اما کادمیم دارای اثر معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بود (جدول ۳). طبق جدول ۴، حضور کادمیم سبب افزایش تنفس پایه شد. این در حالی است که برخی پژوهشگران گزارش کردند که کادمیم اثر منفی بر تنفس دارد (Masto *et al*., 2011; Chen *et al*., 2014). مشابه با نتایج مطالعه حاضر، در پژوهش شی و ما (Shi & Ma, 2017) با افزایش غلظت کادمیم از ۵ به ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک تنفس میکروبی افزایش پیدا کرد. آن‌ها علت این امر را پاسخ دوگانه کادمیم نسبت به فعالیت میکروبی دانستند که ممکن است در غلظت خاصی سبب بعضی واکنش‌های غیر معمول کادمیم گردد. چنی و همکاران (Chaney *et al*., 1978) نیز در نتایج خود به افزایش تنفس پایه در حضور کادمیم اشاره داشتند. طبق نظر لندی و همکاران (Landi *et al*., 2000) افزودن فلزات سنگین به خاک موجب از بین رفتن بخشی از ریزجانداران شده و بنابراین به‌دنبال تجزیه سلول‌های میکروبی مرده توسط ریزجانداران باقی‌مانده، تنفس میکروبی افزایش می‌یابد. این پژوهشگران همچنین عقیده دارند که دلیل نتایج متفاوت ممکن است بخاطر این حقیقت باشد که فرایندهای مختلف دخیل در تنفس خاک، به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم می‌توانند تحت تاثیر فلزات سنگین قرار بگیرند. برپایه یافته‌های دیاز-راوینا و بات (Diaz-Ravina & Baath, 1996) ریزجانداران در هنگام روبرو شدن با تنش‌های وارده به خاک، مانند ورود فلزات سنگین به خاک؛ فعالیت خود را افزایش می‌دهند و انرژی بیشتری برای روبرو شدن با تنش‌ها صرف می‌کنند که این امر با افزایش تنفس نمایان می‌شود. عثمان و همکاران (Usman *et al*., 2005) گزارش کردند که تنفس میکروبی بیشتر در خاک‌های آلوده به دلیل نیاز به انرژی بیشتر برای بقای ریزجانداران خاک قابل توجیه است. زیرا که ریز جانداران خاک این توانایی را دارند که در شرایط نامناسب انرژی را از مسیر رشد سلول به سمت شرایط حفظ سلول سوق دهند. هی و همکاران (He *et al*., 2015) نیز بیان نمودند که ریزجانداران در خاک‌های به-شدت آلوده به انرژی بیشتری برای بقا در شرایط نامطلوب نیاز دارند بنابراین بخش بیشتری از کربن بصورت $CO_2$ آزاد می‌شود و سهم کمتری جذب می‌شود. باید به این نکته توجه شود که استفاده از تنفس میکروبی به تنهایی برای ارزیابی تنش‌های محیطی ممکن است تفسیر نتایج را با چالش روبرو کند. به عقیده ویگ و همکاران (Vig *et al*, 2003) تنفس خاک درواقع فعالیت متابولیکی گستره‌ای از ریزجانداران را منعکس می‌کند که حساسیت برابری به آلاینده‌ها ندارند، بنابراین اندازه‌گیری‌ها بر مبنای این شاخص همیشه معتبر نیست. بررسی منابع نشان داد که در مورد اثر nHAP بر تنفس پایه گزارشی ارائه نشده است تا بتوان نتایج پژوهش حاضر را با آن مقایسه کرد. با این حال پژوهش‌هایی وجود دارد که تاثیر برخی نانوذرات را بر تنفس پایه بررسی کرده‌اند. به عنوان مثال در مطالعه فرنک و همکاران (Frenk *et al*., 2013) مشخص شد که نانوذرات اکسید مس و مگنتیت در حالیکه موجب کاهش پتانسیل اکسیداتیو آنزیم دهیدروژناز شدند، تاثیر معنی‌داری بر تنفس خاک نداشتند. همچنین در پژوهش جی و همکاران (Ge *et al*., 2013) نانوذرات اکسید تیتانیم و اکسید روی سبب تغییر ترکیب جامعه میکروبی خاک شده اما بر تنفس پایه تاثیر معنی داری نداشتند. نتایج آماری این مطالعه نشان داد که اثر ساده زمان و نیز برهمکنش آن با تیمارهای آزمایش بر تنفس پایه بی‌تاثیر بود (جدول ۳). در رابطه با تاثیر برهم‌کنش کادمیم و زمان بر تنفس میکروبی نتایج مختلفی بدست آمده است، برخی نتایج مبتنی بر کاهش سمیت کادمیم با گذشت زمان می‌باشد (Shi & Ma,

2017) و برخی دیگر مبتنی بر افزایش سمیت کادمیم با گذشت زمان است (Masto *et al*., 2011).

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که nHAP در خاک آلوده تاثیری بر فعالیت آنزیم فسفاتاز، دهیدروژناز و تنفس پایه نداشت اما موجب افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آز گردید. این نتایج نشان از عدم پیامد منفی nHAP بر فعالیت-های میکروبی مورد اندازه‌گیری در خاک بود. از طرف دیگر بررسی اثر nHAP به‌عنوان یک ماده اصلاحی در کاهش آلودگی خاک نشان داد که تاثیر آن بر کاهش فراهمی کادمیم قابل توجه نبود. استفاده از نانو مواد هنوز در مرحله تحقیق و توسعه می‌باشد پیشنهاد می‌شود که اثر nHAP بر فعالیت سایر آنزیم‌های خاک و همچنین سایر شاخص های زیستی خاک مانند کربن و نیتروژن زیست توده میکروبی و در بازه‌های زمانی بیشتر نیز مورد مطالعه قرار گیرد تا بتوان نتایج قطعی‌تری را در مورد اثر nHAP بر شاخص‌های زیستی خاک ارائه نمود. همچنین به منظور روشن کردن فاکتورهای دخیل بر اثرگذاری نانوذرات بر شاخص‌های زیستی خاک و تعیین غلظت نانوذرات که می تواند اکوسیستم خاک را تحت تاثیر قرار دهد باید اثر نوع خاک و آزمایشاتی که اثر نانوذرات را بر جامعه میکروبی و رشد گیاه تعیین می‌کنند، صورت گیرد.

## References


Acosta-Martínez V., Cruz L., Sotomayor-Ramírez D., and Pérez-Alegría L. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Soil Ecology*, 35(1): .35-45.

Antisari L.V., Carbone S., Gatti A., Vianello G., and Nannipieri P. 2013. Toxicity of metal oxide ($CeO_2$, $Fe_3O_4$, $SnO_2$) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 60: 87-94.

Baoshan Y., Fei H., Qinglin C., and Hui W. 2015. Toxicological effects of Cd pollution on soil urease activity. In *2015 AASRI International Conference on Circuits and Systems (CAS 2015). Atlantis Press*, pp. 96-98.

Buzea C., Pacheco Blandino I.I., and Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles :Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2: MR17-MR71.

Chaney W.R., Kelly J.M., and Strickland R.C. 1978. Influence of cadmium and zinc on carbon dioxide evolution from litter and soil from a black oak forest 1. *Journal of Environmental Quality*, 7(1): 115-119.

Chen Y.P., Liu Q., Liu Y.J., Jia F.A., and He X.H. 2014. Responses of soil microbial activity to cadmium pollution and elevated $CO_2$. *Scientific reports*, 4, p.4287.

Chen J.H., Wang Y.J., Zhou D.M., Cui Y.X., Wang S.Q., and Chen Y.C. 2010. Adsorption and desorption of Cu (II), Zn (II), Pb (II), and Cd (II) on the soils amended with nanoscale hydroxyapatite. *Environmental progress & sustainable energy*, 29(2): 233-241.

Cui H., Zhou J., Zhao Q., Shi Y., Mao J., Fang G., and Liang J. 2013. Fractions of Cu, Cd, and enzyme activities in a contaminated soil as affected by applications of micro-and nanohydroxyapatite. *Journal of Soils and Sediments*, 13(4): 742-752.

Diaz-Ravina M., and Baath E. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8): 2970-2977. Eivazi F. and Tabatabai M.A. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(3): 167-172.

Ding L., Li J., Liu W., Zuo Q., and Liang S.X. 2017. Influence of Nano-Hydroxyapatite on the metal bioavailability, plant metal accumulation and root exudates of ryegrass for phytoremediation in lead-polluted soil. International *Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(5): 532-540.

Doelman P., and Haanstra L. 1986. Short-and long-term effects of heavy metals on urease activity in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 2(4): 213-218.

El Hadri H., Louie S.M., and Hackley V.A. 2017. Assessing the interactions of metal nanoparticles in soil and sediment matrices–a quantitative analytical multi-technique approach. *Environmental Science*: *Nano*, 5(1): 203-214.

Fan D., Han J., Chen Y., Zhu Y., and Li P. 2018. Hormetic effects of Cd on alkaline phosphatase in soils across particle–size fractions in a typical coastal wetland. *Science of the Total Environment*, 613:792-797.

Frenk S., Ben-Moshe T., Dror I., Berkowitz B., and Minz D. 2013. Effect of metal oxide nanoparticles on microbial community structure and function in two different soil types. *Plos One*, 8(12): e84441.

Ge Y., Schimel J. P., and Patricia A. Holden P. A. 2013. Evidence for negative effects of $TiO_2$ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environmental Science Technology*, 45: 1659–1664.

Gee G.W., and Bauder J.W. 1982. Hydrometer Method. P 383-314, In: Klute, A. (ed), Methods of Soil Analysis: Physical Properties, Part 1, second Ed. Agron Monogr, No 9, Madison WI: ASA and SSSA.

Hassan W., Akmal M., Muhammad I., Younas M., Zahaid K.R., and Ali F. 2013. Response of soil microbial biomass and enzymes activity to cadmium (Cd), 7 (5): 674-680.

He M., Shi H., Zhao X., Yu Y., and Qu B. 2013. Immobilization of Pb and Cd in contaminated soil using nanocrystallite Hydroxyapatite. *Procedia Environmental Sciences*, 18: 657–665.

He Z., Shentu J., Yang X., Baligar V.C., Zhang T., and Stoffella P.J. 2015. Heavy metal contamination of soils: sources, indicators and assessment, 9:17-18.

Jiang J., Oberdorster G., and Biswa P. 2008. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal Nanoparticle Research*, 11:77–89.

Jiang S.D., Yao Q.Z., Zhou G.T., and Fu S.Q. 2012. Fabrication of hydroxyapatite hierarchical hollow microspheres and potential application in water treatment. *The Journal of Physical Chemistry* C, 116(7): 4484-4492.

Kandziora-Ciupa M., Ciepał R., and Nadgorska-Socha A. 2016. Assessment of heavy metals contamination and enzymatic activity in pine forest soils under different levels of anthropogenic stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(3):1-7.

Karaca A., Cetin S.C., Turgay O.C., and Kizilkaya R. 2010. Effects of heavy metals on soil enzyme activities. In Soil heavy metals, Springer, Berlin, Heidelberg, 237-262.

Khan S., Hesham A.E.L., Qiao M., Rehman S., and He J.Z. 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(2): 288-296.

Kim J., Grate J.W., and Wang P. 2006. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, 61: 1017–1026.

Kizilkaya R., Aşkın T., Bayrakli B., and Saglam M. 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Soil Biology*, 40(2): 95-102.

Kumpiene J., Ore S., Renella G., Mench M., Lagerkvist A., and Maurice C. 2006. Assessment of zerovalent iron for stabilization of chromium, copper and arsenic in soil. *Environmental Pollution*, 144: 62-69.

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.

Leinweber P., Jandl G., Baum C., Eckhardt K.U., and Kandeler E. 2008. Stability and composition of soil organic matter control respiration and soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(6): 1496-1505.

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.

Liu W., Zuo Q., Zhao C., Wang S., Shi Y., Liang S., Zhao C., and Shen S. 2018. Effects of Bacillus subtilis and nanohydroxyapatite on the metal accumulation and microbial diversity of rapeseed (*Brassica campestris* L.) for the remediation of cadmium-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution* Research, 25(25): 25217-25226.

Loeppert R. H., and Suarez L. 1996. Carbonate and gypsum. In ‘Methods of soil 10 analysis. Part 3. Chemical methods. (Ed. DL Sparks) Pp: 437–474. *Soil Science Society of America journal*: Madison, WI.

Ma H., Williams P. L., and Diamond S. A. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticlese - A review. *Environmental Pollution*, 172: 76-85.

Marzadori C., Miletti S., Gessa C., and Ciurli S. 1998. Immobilization of Jack Bean Urease on hydroxyapatite: Urease immobilization in alkaline soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1485-1490.

Masto R.E., Ahirwar R., George J., Ram L.C., and Selvi V.A. 2011. Soil biological and biochemical response to Cd exposure. *Open Journal Soil Science*, 1: 8-15.

Mueller N.C., and Nowack B. 2010. Nanoparticles for remediation: solving big problems with little particles. *Elements*, 6(6): 395-400.

Nannipieri P. 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, C.E., Doube. B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace. P.R. (Eds). Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems. CSIRO Publications, Melbourne, Australia: 238-244.

Patil A.J., Muthusamy E., and Mann S. 2004. Synthesis and self- assembly of organoclay- wrapped biomolecules. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(37): 4928-4933.

Remediuos C., Rosario F., and Bastos V. 2012. Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. *Journal of Botany*.1-8.

Rhoades J.D. 1982. Soluble salts. Pp: 167-179, In: Page, A.L. (ed), Methods of Soil Analysis: Chemical and microbiological properties, Part 2. 2nd Ed. Agron. Monogr. No.9, ASA and SSSA, Madison WI.

Sardar K.H., Qing C.A.O., Hesham A.E.L., Yue X., and He J.Z. 2007. Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb. *Journal of Environmental Sciences*, 19(7): 834-840.

Sethi S., and Gupta S. 2015. Responses of soil enzymes to different heavy metals. *Biolife*, 3:147-153.

Shi W., and Ma X. 2017. Effects of heavy metal Cd pollution on microbial activities in soil. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(4): 722-72

Sposito G., Lund L.J., and Chang A.C. 1982. Trace metal chemistry in arid zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in soil phases. *Soil Science Society of America Journal*, 46(2): 260–264.

Tabatabai M. A., and Bremner J. M. 1972. Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(4): 479-487.

Tabatabai M.A., and Bremner J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4): 301-307.

Thalmann A. 1966. The determination of the dehydrogenase activity in soil by means of TTC (triphenyltetrazolium). *Soil Biology*, 6: 46-49.

Usman A., Kuzyakov Y., and Stahr K. 2005. Effect of clay minerals on immobilization of heavy metals and microbial activity in a sewage sludge-contaminated soil. *Journal of Soil Sediment*, 5(4): 245–252.

Vance E.D., Brookes P.C., and Jenkinson D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6): 703-707.

Vig K., Megharaj M., Sethunathan N., and Naidu R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil (a review). *Advances in Environ. Research*, 8(1): 121-135.

Walkley A., and Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1): 29-38.

Wei L., Wang S., Zuo Q., Liang S., Shen S., and Zhao C. 2016. Nano-hydroxyapatite alleviates the detrimental effects of heavy metals on plant growth and soil microbes in e-waste-contaminated soil. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18(6): 760-767.

WHO. 1996. Trace Element in Human Nutrition and Health, WHO, Genova, 361p.

Wieczorek J., Baran A., Urbański K., Mazurek R., and Klimowicz-Pawlas A. 2018. Assessment of the pollution and ecological risk of lead and cadmium in soils. *Environmental Geochemistry and Health*, 40(6): 2325-2342.

Wu C., Yan S., Zhang H., and Luo Y. 2015. Chemical forms of cadmium in a calcareous soil with different levels of phosphorus-containing acidifying agents. *Soil Research*, 53(1): 105–111.

Xie W., Zhou J., Wang H., Chen X., Lu Z., Yu J., and Chen X. 2009. Short-term effects of copper, cadmium and cypermethrin on dehydrogenase activity and microbial functional diversity in soils after long term mineral or organic fertilization. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 129(4): 450-456 .

Yang Y., Dong M., Cao Y., Wang J., Tang M., and Ban Y. 2017. Comparisons of soil properties, enzyme activities and microbial communities in heavy metal contaminated bulk and rhizosphere soils of Robinia pseudoacacia L. in the northern foot of Qinling mountain. *Forests*, 8(11), p.430.

# The Effect of Nano-hydroxyapatite on Some Bioindicators in a Cadmium Contaminated Calcareous Soil

**Zohre farzanegan[1], Ali Reza Astaraei[2]*, Amir Fotovat[3], Amir lakzian[4]**

(Received: May 2019 Accepted: September 2019)

## Abstract

The present study was designed to investigate the effect of Nano hydroxyapatite (nHAP) on some soil bioindicators and availability of cadmium in a polluted calcareous soil. This research was carried out in a factorial arrangement based on completely randomized design with three replications. Treatments included two levels of Cd (0 and 40 mg $kg^{-1}$ soil), two levels of nHAP (0 and 1%) and two incubation times (14 and 28 days). The cadmium chloride solution was uniformly sprayed on the soil surface and equilibrated for a month, then nHAP was added to the soil at 0 and 1 w/w %. The activity of urease, dehydrogenase, and alkaline phosphatase enzymes, basal respiration and bioavilable Cd were measured after 14 and 28 days. Bioavilable Cd was extracted by DTPA. The results showed that the addition of nHAP in the Cd contaminated soil decreased bioavailable Cd by 2.3%, increased the activity of urease enzyme by 98% while had no effect on the activity of phosphatase, dehydrogenase and basal respiration. Investigation of changes of bioindicators in 14 and 28 days incubation in Cd contaminated soil showed that the activity of urease and dehydrogenase enzyme had a declining trend but the activity of phosphatase enzyme and basal respiration did not significantly change. It was also found that bioavailable Cd decreased with incubation time by 10.7%. In general, it may be concluded that nHAP influenced biological index in the calcareous soil differently, but it caused reduction effect on bioavailable cadmium in soil, although this reduction was not considerable.

**Keywords:** Amendment, Enzymatic activity, Heavy metal, Nano particle

Farzanegan Z., Astaraei A., Fotovat A and lakzian A. 2019. The Effect of Nano-hydroxyapatite on Some Bioindicators in a Cadmium Contaminated Calcareous Soil. *Applied Soil Research*. 8(2):22-36.

1. Ph.D Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4. Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
* Corresponding Author Email: astaraei@um.ac.ir