



Temporal Monitoring of Silver Nanoparticle Toxicity on Some Biological Indicators in Two Sandy Loam and Clay Soil Textures

Vahideh Sharifi Golru¹ | Shekoofeh Rezaei² | Ali Khanmirzaei³

1. Department of Soil Science, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran. E-mail: vahidehsharifi20@gmail.com

2. Corresponding Author, Department of Soil Science, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.

E-mail: Shekoofeh.rezaei@iau.ac.ir

3. Department of Soil Science, Ka.C., Islamic Azad University, Karaj, Iran. E-mail: alikhanmirzaei@iau.ac.ir

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: May. 22, 2026

Revised: July. 14, 2026

Accepted: Aug. 16, 2026

Published online: Oct. 23, 2026

Keywords:

*Ecotoxicity,
Phosphatase,
Pollutant aging,
Soil health,
Urease*

ABSTRACT

The increasing entry of silver nanoparticles (Ag-NPs) into soil ecosystems threatens biochemical health and biogeochemical cycles. This study evaluated the ecotoxicity and temporal dynamics (aging) of Ag-NPs on soil enzyme activities across two contrasting soil textures. A laboratory incubation experiment was conducted as a factorial based on a completely randomized design (CRD). Treatments included soil texture (sandy loam and clay), Ag-NP concentration (0, 100, 500, and 1000 mg/kg), and incubation time (7, 24, and 72 days). Urease, acid phosphatase, and alkaline phosphatase activities were measured as biomarkers. Results showed that Ag-NP inhibition strongly depended on soil texture and time. In sandy loam soil, urease was highly vulnerable; 1000 mg/kg reduced its activity by 54% on days 7 and 24 compared with the control. In contrast, clay soil showed greater buffering capacity. A pronounced hormesis effect occurred for alkaline phosphatase in clay soil: 100 mg/kg on day 7 increased activity by 109% relative to the control, and stimulation stabilized at a persistent 21% increase on days 24 and 72. For acid phosphatase in clay soil, initial inhibition at 1000 mg/kg almost fully recovered by day 24 (8% decline), but a 16% decline reappeared by day 72. Clay colloids and organic carbon likely mitigated Ag-NP toxicity through chelation and reduced bioavailability, whereas light soils remained highly vulnerable without this protective barrier. These findings highlight the importance of soil properties in determining nanoparticle ecological impacts. Nevertheless, temporal monitoring showed that pollutant aging remains a silent long-term ecological risk, even in colloid-rich soils.

Cite this article: Sharifi Golru, V., Rezaei, Sh., Khanmirzaei, A., (2026) Temporal Monitoring of Silver Nanoparticle Toxicity on Some Biological Indicators in Two Sandy Loam and Clay Soil Textures, *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 57 (8), 1891-1908. <https://doi.org/10.22059/ijswr.2026.414404.670147>

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2026.414404.670147>



EXTENDED ABSTRACT

Introduction

The rapid development and widespread application of nanotechnology in recent decades have inevitably led to the extensive release of engineered nanomaterials into the environment and biological cycles. Among these emerging materials, silver nanoparticles (Ag-NPs) have secured a prominent position in various sectors, including medicine, textiles, food packaging, wastewater treatment, and modern agricultural inputs, owing to their unique physicochemical properties, high surface-area-to-volume ratio, and exceptional antimicrobial capabilities. Recent global estimates indicate that the annual production of these nanoparticles has exceeded hundreds of tons. Consequently, a significant portion of these engineered nanoparticles eventually finds its way into the soil ecosystem through various pathways, such as the discharge of industrial and municipal wastewater, the application of sewage sludge as a soil amendment or fertilizer in agricultural lands, and the direct use of nano-based pesticides and fertilizers. Soil acts as the ultimate environmental sink for these modern contaminants. The accumulation of Ag-NPs in the surface horizons, where the highest concentration of biological activity occurs, poses a severe challenge to the functional stability, biodiversity, and biochemical health of terrestrial ecosystems. Soil quality, health, and fertility are directly linked to the dynamic activity of microbial communities and the secretion of extracellular enzymes. Soil enzymes, acting as biological catalysts, play a pivotal role in the decomposition of organic residues, the mineralization of essential nutrients, and the stabilization of soil organic matter. Among these, the urease enzyme, which plays a key role in urea hydrolysis and the nitrogen cycle, and phosphatases, which are responsible for releasing inorganic phosphorus from organic compounds in the phosphorus cycle, are considered some of the most sensitive and reliable biochemical indicators for assessing environmental toxicity. The primary mechanism of Ag-NP toxicity on these biocatalysts mainly occurs through the process of oxidative dissolution and the continuous, gradual release of silver ions (Ag^+) into the soil solution. These free cationic ions have a strong thermodynamic affinity to interact with the functional groups of proteins, particularly the sulfhydryl or thiol ($-\text{SH}$) groups in the structure of the amino acids that make up the enzymes, leading to conformational changes (denaturation) and the blocking of the active site. Furthermore, Ag-NPs can induce oxidative stress through the excessive production of reactive oxygen species, leading to lipid peroxidation and the destruction of microbial cell membranes. Despite numerous toxicological studies, a major gap in the ecotoxicology of nanomaterials is the neglect of temporal dynamics, commonly referred to as the "aging" phenomenon. Toxicity in the heterogeneous soil environment is not a static phenomenon; it undergoes fundamental physical and chemical changes over time due to processes like aggregation, sulfidation, and surface coating by dissolved organic matter, which directly affect bioavailability. Furthermore, the severity of this toxicity is heavily influenced by the intrinsic properties of the soil, particularly its texture and colloidal content. Therefore, the present study was designed with the comprehensive aim of (1) monitoring the dose-dependent effects of varying levels of Ag-NPs on the key functional enzymes urease, acid phosphatase, and alkaline phosphatase, and (2) rigorously evaluating the role of pollutant aging (over sequential intervals of 7, 24, and 72 days) across two contrasting soil textures (sandy vs. clay). The overarching goal is to realistically assess the biochemical resilience and self-purification capacity of calcareous soils against this emerging nanotoxicity.

Materials and Method

To monitor the ecotoxicological behavior of nanoparticles, composite sampling from the surface soil horizon (0-30 cm depth) was conducted in two agricultural regions with distinctly different pedological characteristics. The first soil was collected from agricultural lands in the suburbs of Karaj, while the second was obtained from the Chitgar area. Samples were air-dried in the shade at room temperature and passed through a standard 2-mm sieve. Physicochemical analysis revealed two contrasting ecological matrices: the first was a light-textured sandy loam soil (58.2% sand, 19.8% clay) characterized by a poor organic carbon content (0.70%); the second was a heavy-textured clay soil containing 49.8% clay and a relatively rich organic carbon content (1.37%), providing a significantly higher potential for surface interactions with pollutants. The stress-inducing agent used in this study was analytical-grade (99.99% purity) silver nanoparticle powder with a spherical morphology, a hydrodynamic diameter of approximately 20 nm, and a specific surface area ranging from 18 to 22 m^2/g . To prevent laboratory errors and synergistic/antagonistic interferences from chemical solvents and stabilizers, and to accurately simulate the dry atmospheric deposition of pollutants, the uncoated nanoparticles were applied as a dry powder. The research was implemented as a microcosm incubation experiment organized in a factorial framework based on a completely randomized design (CRD) with three replications. The independent variables included soil texture (sandy and clay), Ag-NP concentration (0 as the control, 100, 500, and 1000 mg/kg of dry soil), and temporal dynamics or aging (sampled at 7, 24, and 72

days). The microcosms were prepared by adding the precise weight of Ag-NPs to 100 g of dry soil, followed by 30 minutes of mechanical mixing to ensure homogeneous distribution. Soil moisture was adjusted to 60% of the field capacity using distilled water. The experimental units were incubated in absolute darkness at a constant temperature of 25°C. At the specified intervals, destructive sampling was performed. Urease activity was assessed using the Zantua and Bremner protocol, where ammonium released from urea hydrolysis was measured via Nesslerization at 410 nm. Acid and alkaline phosphatase activities were determined based on the Eivazi and Tabatabai method, measuring the release of p-nitrophenol at 400 nm after incubation with p-nitrophenyl phosphate in specific buffers (pH 6.5 and 11, respectively). Prior to statistical modeling, data normality was confirmed. Due to the fundamental structural differences between the two soils and the confirmation of heterogeneous error variances by Bartlett's test, independent Analyses of Variance (ANOVA) were conducted for each soil matrix using SAS software. Mean comparisons were performed using Duncan's Multiple Range Test at the 5% and 1% probability levels.

Results

The baseline biological potential evaluated via independent T-tests prior to nanoparticle treatment revealed that the sandy loam soil possessed significantly higher basal urease and alkaline phosphatase activities, whereas the clay soil exhibited greater basal acid phosphatase activity, indicating distinct inherent biochemical capacities. The ANOVA results demonstrated that the main effects of incubation time, Ag-NP concentration, and their interaction were highly significant for most enzymatic traits, proving that the inhibitory effect of silver nanoparticles is a highly dynamic process dictated by the soil matrix. In the light-textured sandy soil, urease showed the most severe dose-dependent vulnerability. On day 7, the application of 1000 mg/kg Ag-NPs plummeted urease activity by 57% compared to the control. This suppressive effect persisted robustly through day 24, resulting in a 52% decline. By day 72, the basal urease potential in the sandy soil had dropped significantly due to substrate depletion, and high concentrations of Ag-NPs maintained a chronic inhibitory state. Acid phosphatase in the sandy soil also displayed high susceptibility, particularly on day 24, where the 500 mg/kg dose caused a severe 55% reduction in catalytic activity. Conversely, the heavy clay soil demonstrated a remarkable and robust buffering capacity. Although urease activity in the clay soil experienced an initial dose-dependent decline on day 7 (dropping by up to 67% at the highest dose), it showed a fascinating stabilization over time. By day 72, the activities at 100 and 500 mg/kg Ag-NPs converged entirely with the control, showing less than a 7% fluctuation, thus confirming the protective role of clay colloids. More strikingly, the presence of Ag-NPs in the clay soil induced a clear hormesis effect on alkaline phosphatase. The application of 500 mg/kg Ag-NPs led to an astonishing 82% surge in alkaline phosphatase activity relative to the control on day 7. As the pollutant aged (days 24 and 72), this stimulation stabilized into a persistent 24% to 31% increase, indicating a strong compensatory response from the microbial community to overcome the initial oxidative stress. For acid phosphatase in the clay soil, the initial toxicity was fully neutralized by day 24, achieving a 100% recovery even at the maximum dose of 1000 mg/kg; however, the cumulative effects of aging and continuous ion dissolution led to a delayed, chronic toxicity, reducing its activity again by 24% on day 72.

Conclusions

The findings of this comprehensive study verify that the introduction of engineered silver nanoparticles into soil ecosystems poses a critical, complex, and time-dependent threat to biochemical health. The ecological toxicity of Ag-NPs is not merely a function of contaminant concentration; rather, it is profoundly modulated by the pedological characteristics of the receiving matrix and the aging duration. Light-textured sandy soils, suffering from colloidal poverty and low organic carbon, exhibit acute ecological sensitivity. In the absence of sufficient binding sites, silver ions remain highly bioavailable in the soil solution, leading to severe and irreversible biochemical degradation, specifically crippling the nitrogen cycle as evidenced by the dramatic collapse of urease activity. On the other hand, heavy clay soils act as potent ecological buffers. The high specific surface area, negative charge of clay minerals, and abundance of humic substances facilitate physical stabilization, surface adsorption, and intense chelation of free silver ions. This mechanism drastically reduces bioavailability and allows microbial communities to execute adaptive responses, such as hormesis and medium-term functional recovery. However, the temporal monitoring clearly illustrated that pollutant aging does not uniformly equate to detoxification. In heavy soils, while medium-term recovery is possible, the continuous oxidative dissolution of high-dose nanoparticles eventually overwhelms the soil's protective barriers, manifesting as delayed, chronic toxicity in the long term. Conclusively, this study emphasizes that environmental risk assessments and regulatory frameworks for the disposal of nanomaterial waste must transition from relying on short-term, acute toxicity paradigms. Instead, standards must be explicitly tailored



to incorporate site-specific buffering capacities and long-term aging dynamics to prevent the prolonged degradation of agricultural soil fertility and safeguard terrestrial biogeochemical cycles.

Funding

This work was supported by the Department of Soil Science, Ka. C., Islamic Azad University, Karaj, Iran as a M.Sc. project of the first author of the manuscript. The founder had no role in the study design, data collection, analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Authorship contribution

Conceptualization Sh. R. and A. Kh., methodology, Sh. R., software, A. Kh., validation, Sh. R. and A. Kh., formal analysis, A. Kh., investigation, Sh. R., resources, Sh. R., data curation, Sh. R., writing—original draft preparation, Sh. R. and A. Kh., writing—review and editing, Sh. R. and A. Kh., visualization, Sh. R., supervision, Sh. R., project administration, Sh. R., funding acquisition, Sh. R. and A. Kh., All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

Generative AI and AI-assisted technologies were not used in writing this article.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable requests.

Acknowledgements

The authors would like to thanks the Karaj branch of Islamic Azad University for kindly providing the equipment used in this study.

Ethical considerations

Ethical principles were considered by all authors during the conducting and publishing of this study.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

پایش زمانی سمیت نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های زیستی در دو خاک لومی‌شنی و رسی

وحیده شریفی‌گلرو^۱ | شکوفه رضائی^۲ | علی خانمیرزایی^۳^۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. رایانامه: vahidehsharifi20@gmail.com^۲. نویسنده مسئول، گروه خاکشناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. رایانامه: Shekoofeh.rezaei@iau.ac.ir^۳. گروه خاکشناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران. رایانامه: alikhhanmirzaei@iau.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۳/۱	ورود روزافزون نانوذرات نقره به اکوسیستم‌های خاکی، سلامت بیوشیمیایی و چرخه‌های بیوژئوشیمیایی را تهدید می‌کند. این پژوهش با هدف ارزیابی اکوتوکسیکولوژیک و پایش دینامیک زمانی نانونقره بر فعالیت آنزیم‌های خاک در دو بافت متفاوت انجام گرفت. انکوباسیون آزمایشگاهی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی (CRD) اجرا گردید. متغیرهای مستقل شامل نوع بافت خاک (لومی‌شنی و رسی)، غلظت نانونقره (۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زمان انکوباسیون (۷، ۲۴ و ۷۲ روز) بودند. پویایی آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز اسیدی و قلیایی به‌عنوان شاخص‌های زیستی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد شدت بازدارندگی نانونقره، تابع بافت خاک و زمان است. در خاک لومی‌شنی، آنزیم اوره‌آز به‌شدت آسیب‌پذیر بود؛ به‌طوری‌که غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم نانونقره، فعالیت آن را در روزهای ۷ و ۲۴ به‌ترتیب ۵۴ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. در مقابل، خاک رسی ظرفیت بافری بالایی نشان داد. پدیده هورمسیس بسیار شدیدی برای آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک رسی مشاهده شد؛ به‌نحوی که کاربرد ۱۰۰ میلی‌گرم نانونقره در روز ۷ باعث جهش ۱۰۹ درصدی فعالیت نسبت به شاهد گردید و این تحریک در روزهای ۲۴ و ۷۲ در سطح افزایش ۲۱ درصدی پایدار ماند. در خصوص فسفاتاز اسیدی در خاک رسی، بازدارندگی آلاینده ۱۰۰۰ میلی‌گرم در روز ۲۴ تقریباً به‌طور کامل بازیابی گردید (تنها ۸ درصد افت)، اما در روز ۷۲ مجدداً افت ۱۶ درصدی ثبت شد. به نظر می‌رسد کلونیدهای رس و کربن آلی با مکانیسم کلاته‌سازی و کاهش زیست‌فراهمی، نقش حیاتی در تعدیل سمیت نانونقره ایفا می‌کنند. خاک‌های سبک در غیاب این سد حفاظتی به‌شدت آسیب‌پذیرند. با این وجود، پایش زمانی نشان داد که فرآیند پیرشدگی آلاینده حتی در خاک‌های غنی از کلونید نیز می‌تواند یک ریسک اکولوژیک خاموش در بلندمدت محسوب شود.
واژه‌های کلیدی: اوره‌آز، پیرشدگی آلاینده، سلامت خاک، سمیت اکولوژیک، فسفاتاز	
استناد: شریفی‌گلرو؛ وحیده، رضائی؛ شکوفه، خانمیرزایی؛ علی، (۱۴۰۵) پایش زمانی سمیت نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های زیستی در دو خاک لومی‌شنی و رسی، مجله تحقیقات آب و خاک ایران، ۵۷ (۸)، ۱۹۰۸-۱۸۹۱. https://doi.org/10.22059/ijswr.2026.414404.670147	
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.	© نویسندگان.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijswr.2026.414404.670147	



مقدمه

توسعه شتابان نانو تکنولوژی در دهه های اخیر، منجر به ورود گسترده نانومواد مهندسی شده به چرخه های زیستی گشته است. در این میان، نانوذرات نقره (Ag-NPs) از ویژگی های منحصر به فرد فیزیوشیمیایی و نسبت سطح به حجم بسیار بالایی برخوردارند و به دلیل خواص بازدارندگی زیستی فوق العاده در برابر طیف وسیعی از باکتری ها و قارچ ها، جایگاه ویژه ای در صنایع پزشکی، نساجی، تصفیه آب، بسته بندی مواد غذایی و به ویژه نهاده های نوین کشاورزی یافته اند (Bamal et al., 2021; Sharma et al., 2021). گزارش های اخیر حاکی از آن است که تولید جهانی این نانوذرات به شدت در حال افزایش بوده و از مرز صدها تن در سال فراتر رفته است (Temizel-Sekeryan, 2019; Hicks, 2019; Hochella et al., 2019). بخش عمده ای از این نانوذرات تولیدی، پس از طی چرخه مصرف، از مسیرهایی نظیر تخلیه پساب های صنعتی و شهری، کاربرد لجن فاضلاب به عنوان اصلاح کننده و کود در اراضی کشاورزی، و همچنین استفاده مستقیم از آفت کش ها و کود های نانوپایه، در نهایت به بستر خاک منتقل می شود (Levard et al., 2012). خاک به عنوان یک مخزن نهایی، محل تجمع این آلاینده های نوین است و انباشت آن ها در افق های سطحی، جایی که بیشترین فعالیت بیولوژیک رخ می دهد، می تواند پایداری عملکردی و تنوع زیستی اکوسیستم های خشکی را با چالش جدی مواجه سازد.

کیفیت، سلامت و باروری خاک به طور مستقیم به فعالیت پویای جوامع میکروبی و ترشح آنزیم های خارج سلولی توسط آن ها گره خورده است. آنزیم های خاک، به عنوان کاتالیزورهای بیولوژیک، نقش محوری در تجزیه بقایای آلی، معدنی شدن عناصر غذایی و پایداری ماده آلی ایفا می کنند. در این میان، آنزیم اوره آز که نقش کلیدی در هیدرولیز اوره و چرخه نیتروژن دارد، و فسفاتازها که مسئول آزادسازی فسفر معدنی از ترکیبات آلی در چرخه فسفر هستند، از حساس ترین و قابل اعتمادترین شاخص های بیوشیمیایی برای ارزیابی سمیت آلاینده های محیطی و پایش سلامت خاک محسوب می شوند (Micuti et al., 2020). مکانیسم اصلی سمیت نانوذرات نقره بر این کاتالیزورهای زیستی عمدتاً از طریق فرآیند انحلال اکسیداتیو و آزادسازی مستمر و تدریجی یون های نقره (Ag^+) در محلول خاک صورت می گیرد. این یون های آزاد کاتیونی تمایل ترمودینامیکی شدیدی به برهم کنش با گروه های عاملی پروتئین ها، به ویژه گروه های سولفیدریل یا تیول (-SH) در ساختار اسیدهای آمینه سازنده آنزیم ها دارند. این اتصال منجر به تغییر شکل فضایی و مسدود شدن جایگاه فعال آنزیم می گردد (Tortella et al., 2020). علاوه بر این سمیت مستقیم یونی، نانوذرات نقره می توانند با القای استرس اکسیداتیو از طریق تولید بی رویه گونه های فعال اکسیژن، منجر به پراکسیداسیون لیپیدی، تخریب غشای سلولی ریزجانداران و آسیب به ساختارهای سلولی شوند که این امر در نهایت موجب کاهش زیست توده میکروبی و توقف سنتز و ترشح آنزیم های جدید به محیط خاک می گردد (Chen et al., 2024; Yousefi et al., 2023).

با این وجود، یکی از چالش های اساسی و خلاء های موجود در بسیاری از مطالعات اکوتوکسیکولوژی نانومواد، نادیده گرفتن پویایی زمانی یا پدیده پیرشدگی آلاینده در محیط طبیعی است. سمیت نانوذرات در محیط ناهمگن و پیچیده خاک، پدیده ای ایستا نبوده و با گذشت زمان دستخوش تغییرات بنیادین فیزیکی و شیمیایی می شود. نانوذرات نقره پس از ورود به ماتریس خاک، می توانند تحت تأثیر فرآیندهای دگرگونی محیطی نظیر به هم چسبیدن و کلوخه ای شدن، واکنش با لیگاند های محیطی، سولفیداسیون و تبدیل به ترکیبات نامحلول نظیر سولفید نقره (Ag_2S)، و همچنین پوشش دهی سطحی توسط مواد آلی محلول قرار گیرند (Levard et al., 2012; Courtois et al., 2019). این دگرگونی ها مستقیماً بر میزان انحلال پذیری و زیست فراهمی نانوذرات و یون های نقره اثرگذار است. مطالعات اخیر نشان داده اند که اگرچه ورود ناگهانی نانونقره ممکن است در کوتاه مدت شوک سمی شدیدی به جمعیت های میکروبی وارد کرده و فعالیت های بیوشیمیایی را متوقف سازد، اما با گذشت زمان و وقوع فرآیند پیرشدگی، کاهش زیست فراهمی آلاینده می تواند شرایط را برای سازگاری میکروبی و بازیابی فعالیت های آنزیمی فراهم آورد (Schultz et al., 2018). درک دقیق این دینامیک زمانی برای ارزیابی واقع بینانه ریسک اکولوژیک نانومواد در بلندمدت امری حیاتی است.

از سوی دیگر، رفتار، سرنوشت و شدت سمیت نانوذرات نقره در محیط های خاکی به شدت تحت تأثیر ویژگی های ذاتی و خصوصیات فیزیوشیمیایی بستر، به ویژه نوع بافت خاک و محتوای کلئیدهای معدنی و آلی قرار دارد. کانی های رس و ترکیبات هوموسی خاک با

برخورداری از سطوح ویژه بسیار بالا، بار الکتریکی منفی و ظرفیت تبادل کاتیونی قابل توجه، پتانسیل بالایی در جذب سطحی، کلاته‌سازی یون‌های نقره و تثبیت فیزیکی نانوذرات دارند (Cornelis et al., 2014). این اجزای کلوئیدی عملاً به عنوان یک سد حفاظتی یا بافر عمل کرده و از تماس مستقیم آلاینده با میکروارگانیسم‌ها می‌کاهند. لذا از منظر اکولوژیک پیش‌بینی می‌شود که شدت اثرات بازدارنده و سمیت نانونقره در خاک‌های با بافت سبک (مانند خاک‌های شنی) به دلیل فقر کلوئیدی و ظرفیت بافری بسیار پایین، به مراتب مخرب‌تر و پایدارتر از خاک‌های سنگین (مانند خاک‌های رسی) باشد (Zhang et al., 2024; Cornelis et al., 2014).

با توجه به توسعه روزافزون استفاده از نانومواد و وسعت بالای خاک‌های آهکی در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران که دارای ویژگی‌های پدولوژیکی خاص خود هستند، دانش فعلی در خصوص پویایی زمانی سمیت نانونقره در این بسترها همچنان محدود است. بیشتر پژوهش‌های پیشین تنها بر اثرات کوتاه‌مدت و حاد تمرکز داشته و نقش توأمان بافت خاک و گذشت زمان را در یک ساختار یکپارچه ارزیابی نکرده‌اند. لذا پژوهش حاضر با هدف جامع (۱) پایش اثرات سطوح مختلف نانوذرات نقره بر فعالیت آنزیم‌های کلیدی اوره‌آز و فسفاتاز (اسیدی و قلیایی) و (۲) ارزیابی دقیق نقش پیرشدگی آلاینده (در بازه‌های زمانی متوالی ۷، ۲۴ و ۷۲ روز) در دو بافت خاک کاملاً متفاوت (لومی‌شنی و رسی) تدوین و اجرا گردید تا پایداری بیوشیمیایی و ظرفیت خودپالایی خاک‌های آهکی در برابر این تنش نوین به شکلی واقع‌بینانه مورد واکاوی قرار گیرد.

پیشینه تحقیق

تحقیقات متعددی در مورد اثرات نانو فلزات به عنوان ترکیباتی با سطح ویژه و واکنش‌پذیری بالا بر ریزجانداران و آنزیم‌های خاک در ایران (رضائی و همکاران، ۱۴۰۵) و نقاط مختلف جهان (Pareek et al., 2018; Reidy et al., 2013; Nowack et al., 2015) انجام گرفته است. با این حال نانو ذرات نقره به دلیل اثرات سمیت در غلظت‌های بسیار کم مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند (Nowack et al., 2015). نتایج تحقیقات صورت گرفته، شواهدی از رفتار دوگانه نانو ذرات نقره ورودی به خاک بر جمعیت میکروبی نشان می‌دهد که این موضوع عمدتاً تحت تاثیر غلظت عنصر ورودی و ویژگی‌هایی از خاک همچون pH، ماده آلی و بافت بوده است (Hansch and Emmerling, 2010; Cornelis et al., 2012).

در مطالعه Mishra et al (۲۰۲۱)، فعالیت آنزیم‌های فنل اکسیداز و آریل آمیداز در یک بازه زمانی ۳۰ روزه تحت تأثیر غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دارای اثرات تحریکی گذرا بوده، در حالی که غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اثرات مهارکننده به همراه داشته است. (Hong et al., 2025) نیز با در نظر گرفتن بازه زمانی ۶۰ روزه و غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانو ذرات نقره بر آنزیم‌های بتا-زیلوسیداز، بتا-گلوکوزیداز و سلوبیوهیدرولاز نتایج مشابهی را در غلظت‌های کم و زیاد مشاهده کردند.

Zhang et al. (2024) با بررسی طیف وسیعی از مطالعات انجام‌گرفته پیرامون اثرات نانوذرات نقره ورودی به خاک‌هایی با ویژگی‌های مختلف بر فعالیت‌های آنزیمی، به این نتیجه رسیدند که از بین ویژگی‌های خاک، به ترتیب pH، ماده آلی، بافت خاک و ظرفیت تبادل کاتیونی بیشترین تاثیر را بر تعدیل یا تشدید اثرات این فلز بر جمعیت میکروبی و آنزیم‌های برون سلولی آنها دارند. یکی از عوامل تأثیرگذار در شدت و سمیت نانو ذرات نقره ورودی به خاک، بافت خاک می‌باشد. به نظر می‌رسد هر چه بافت خاک سنگین‌تر می‌شود، اثرات سمیت این نانوذرات نسبت به بافت‌های سبک‌تر کمتر می‌شود. این موضوع توسط Rahmatpour et al. (2018) در مقایسه انتقال نانو ذرات نقره در دو خاک شنی و رسی تأیید شده است. Grun et al. (2019) با بررسی سمیت نانو ذرات نقره بر جمعیت میکروبی در چند خاک با بافت مختلف، کاهش فعالیت میکروبی در خاک‌های شنی را بیشتر از خاک‌های رسی مشاهده کردند. بررسی‌ها نشان می‌دهد اثر نانو ذرات نقره بر فعالیت‌های میکروبی در خاک به مرور زمان کاهش می‌یابد. مطالعه Bazoobandi et al. (2022) نشان داد که نانوذرات نقره در روز اول باعث کاهش شدید فعالیت آنزیمی در خاک شده و بعد از مدت ۹۰ روز فعالیت‌های آنزیمی خاک مجدداً به حالت اولیه بازگشت.

مواد و روش‌ها

مکان نمونه‌برداری و مشخصه‌های خاک

به منظور پایش رفتار و سمیت محیطی نانوذرات، نمونه‌برداری مرکب از لایه سطحی خاک (عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری) در دو منطقه



کشاورزی با ویژگی‌های خاک‌شناسی کاملاً متمایز انجام پذیرفت. این مناطق شامل اراضی زراعی حومه کرج (واقع در عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۵۵ دقیقه شرقی) و منطقه چیتگر (با مختصات جغرافیایی ۳۵ درجه و ۴۳ دقیقه عرض شمالی و ۵۱ درجه و ۱۳ دقیقه طول شرقی) بودند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، در سایه و دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) هواخشک شدند. سپس به منظور دستیابی به بستری همگن، بقایای گیاهی و سنگریزه‌ها حذف شده و خاک‌ها از الک استاندارد با منافذ دو میلی‌متری عبور داده شدند.

پارامترهای پایه فیزیکوشیمیایی بسترها با استفاده از پروتکل‌های استاندارد آزمایشگاهی تعیین گردید؛ توزیع اندازه ذرات و کلاس بافتی خاک با بهره‌گیری از روش هیدرومتری (Gee and Bauder, 1986)، میزان اسیدیته (pH) در عصاره گل اشباع با استفاده از دستگاه pH متر (Thomas, 1996) و درصد کربن آلی بر اساس روش اکسیداسیون تر والکلی-بلاک (Walkley and Black, 1934) اندازه‌گیری شد.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آلاینده نانو

در این پژوهش، از پودر نانوذرات نقره با درجه خلوص تحلیلی (۹۹/۹۹ درصد) محصول شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد، ایران) به عنوان عامل تنش‌زای محیطی استفاده شد. ارزیابی‌های مورفولوژیک و مشخصه‌یابی‌های فیزیکی نشان داد که ذرات دارای ساختار هندسی کروی، میانگین قطر هیدرودینامیکی ۲۰ نانومتر و مساحت سطح ویژه در گستره ۱۸ تا ۲۲ مترمربع بر گرم می‌باشند. جهت ممانعت از بروز خطاهای آزمایشگاهی و تداخلات سینرژیستی یا آنتاگونیستی ناشی از حلال‌های شیمیایی و پایدارکننده‌ها و همچنین به منظور شبیه‌سازی دقیق و واقع‌بینانه شرایط نهشت خشک اتمسفری آلاینده‌ها در اکوسیستم‌های خاکی، نانوذرات بدون هیچ‌گونه پوشش سطحی و به صورت پودر خشک و خالص به واحدهای آزمایشی تلقیح شدند.

طراحی آزمایش و پیاده‌سازی ریزبوم (میکروکازم)^۱

پژوهش حاضر به صورت یک آزمایش انکوباسیون ریزبوم در قالب طرح فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی (CRD) انجام شد. آزمایش شامل سه عامل بود: بافت خاک در دو سطح (لومی‌شنی و رسی)، غلظت نانوذرات نقره در چهار سطح (۰ به عنوان شاهد، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک خشک) و زمان انکوباسیون/پیرشدگی در سه مقطع (۷، ۲۴ و ۷۲ روز). هر ترکیب تیماری با سه تکرار اجرا شد؛ از این رو، در مجموع ۷۲ واحد آزمایشی مستقل ($3 \times 3 \times 4$) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌برداری در هر زمان از واحدهای آزمایشی مستقل انجام شد، مشاهدات ثبت شده در زمان‌های مختلف مستقل از یکدیگر بوده و داده‌ها در قالب یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی تحلیل شدند. انتخاب غلظت‌های بالای نانونقره (نظیر ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) که فراتر از سطح پایه محیطی هستند، با هدف شبیه‌سازی سناریوهای بدبینانه^۲ نظیر تجمع بلندمدت ناشی از کاربرد مداوم لجن فاضلاب آلوده، نشت‌های نقطه‌ای پساب‌های صنعتی، و همچنین ارزیابی حد نهایی تحمل و آستانه شکست اکولوژیک خاک صورت گرفت (Wang et al., 2022). افزون بر این، فواصل زمانی انکوباسیون (تا ۷۲ روز) به منظور پایش دقیق مراحل سمیت شامل شوک حاد اولیه (روز ۷)، مرحله سازگاری (روز ۲۴) و اثرات مزمن (روز ۷۲) انتخاب گردیدند که در مطالعات پیشین نیز به عنوان بازه زمانی استاندارد برای مشاهده روند پیرشدگی در شرایط میکروکازم تأیید شده است (Wu et al., 2021).

جهت استقرار واحدهای آزمایشی، مقادیر دقیق وزنی از آلاینده نانو به ۱۰۰ گرم خاک خشک پایه افزوده شد. به منظور حصول اطمینان از پخش یکنواخت ذرات در شبکه تخلخل خاک و ایجاد تماس حداکثری میان کلوئیدها و نانوذرات، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه تحت اختلاط مکانیکی دقیق قرار گرفتند. در مرحله بعد، میزان رطوبت بسترها با استفاده از آب مقطر دیونیزه تا رسیدن به ۶۰ درصد گنجایش زراعی تنظیم گردید. ظروف آزمایشی (از جنس پلی‌اتیلن مجهز به منافذ تبادل گازی) جهت طی فرآیند گرمخانه‌گذاری به اتاقک رشد با شرایط تاریکی مطلق (جهت جلوگیری از رشد جلبک‌ها و فتواکسیداسیون نقره) و دمای کنترل شده ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پایش رطوبت به صورت دوره‌ای (توزین وزنی) انجام و آب از دست رفته جبران گردید. در نهایت، نمونه‌برداری مخرب^۴ در موعدهای زمانی مقرر جهت استخراج و سنجش آنزیم‌ها صورت پذیرفت.

۱. واحد آزمایشی کوچک‌مقیاس

2. Microcosm

3. Worst-case scenarios

4. Destructive sampling

سنجش فعالیت‌های آنزیمی خاک

پایش سلامت بیوشیمیایی بسترها از طریق سنجش پتانسیل کاتالیزوری آنزیم‌های هیدرولیتیک کلیدی با بهره‌گیری از تکنیک‌های رنگ‌سنجی و خوانش طیف‌سنجی به شرح زیر انجام گرفت:

سنجش آنزیم اوره‌آز: فعالیت اوره‌آز با اقتباس از پروتکل استاندارد زانتوا و برمنر (Zantua and Bremner, 1977) ارزیابی شد.

بدین منظور، ۵ گرم از نمونه خاک مرطوب توزین شده و با ۱/۵ میلی‌لیتر تولوئن (به عنوان بازدارنده تکثیر میکروبی حین زمان واکنش) تیمار گردید. پس از ۱۰ دقیقه، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول اوره به عنوان سوبسترا افزوده شد و مخلوط واکنش به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در پایان دوره، یون‌های آمونیوم با استفاده از محلول استیک اسید ۰/۳ مولار استخراج و صاف شدند. غلظت آمونیوم پس از واکنش با معرف نسلر و تولید کمپلکس رنگی، در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت گردید. به منظور حذف اثر آمونیوم زمینه خاک، تیمارهای شاهد نیز با همان شرایط آماده شدند، با این تفاوت که سوبسترای اوره بلافاصله پیش از مرحله عصاره‌گیری به آن‌ها اضافه شد.

سنجش آنزیم‌های فسفاتاز: پتانسیل کاتالیزوری ایزوآنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی بر مبنای روش عیوضی و طباطبایی (Eivazi and Tabatabai, 1977) تعیین گردید.

در این روش، ۱ گرم نمونه خاک در مجاورت ۰/۲۵ میلی‌لیتر تولوئن و ۴ میلی‌لیتر بافر جهانی اصلاح‌شده قرار گرفت. اسیدیته بافر برای سنجش فسفاتاز اسیدی روی ۶/۵ و برای فسفاتاز قلیایی روی ۱۱ تنظیم شد. با افزودن آنالوگ سوبسترای پارا-نیتروفنیل فسفات، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. توقف واکنش آنزیمی با افزودن کلرید کلسیم و هیدروکسید سدیم انجام پذیرفت و میزان پارا-نیتروفنول تولیدی در طول موج ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری و پردازش داده‌ها

داده‌ها در محیط نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) تجزیه و تحلیل شدند. مدل آماری شامل اثرات اصلی بافت خاک، غلظت نانوذرات نقره و زمان انکوباسیون و نیز تمامی اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه بود. پیش از انجام تجزیه واریانس، مفروضات آماری شامل نرمال بودن باقیمانده‌ها و همگنی واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های Shapiro-Wilk و Levene بررسی شدند. پس از احراز این مفروضات، تجزیه واریانس فاکتوریل سه‌عاملی برای هر یک از صفات انجام شد و در موارد معنی‌دار بودن اثرات، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در دو سطح احتمال اطمینان ۵ درصد و ۱ درصد انجام گرفت. برای نمایش گروه‌بندی میانگین‌ها نیز از حروف همگن استفاده شد. در نهایت، مصورسازی روندها و ترسیم گراف‌های تغییرات با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel انجام شد.

یافته‌های پژوهش

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

نتایج حاصل از آنالیز فیزیکوشیمیایی خاک‌های مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، این دو بستر از نظر ویژگی‌های ساختاری و محتوای ماده آلی تفاوت‌های بارزی با یکدیگر دارند که این تضاد، ارزیابی دقیق نقش ماتریس خاک در پیرشدگی و تعدیل سمیت نانوذرات نقره را امکان‌پذیر می‌سازد. خاک اول با دارا بودن ۵۸/۲ درصد شن و تنها ۱۹/۸ درصد رس، در کلاس بافتی سبک (لومی‌شنی) طبقه‌بندی گردید. این خاک از نظر محتوای کربن آلی نیز بسیار فقیر (۰/۷ درصد) ارزیابی شد. در مقابل، خاک دوم با دارا بودن ۴۹/۸ درصد رس و ۳۲ درصد سیلت، در کلاس بافت سنگین (رسی) قرار دارد. علاوه بر این، محتوای کربن آلی در این خاک (۱/۳۷ درصد) تقریباً دو برابر خاک لومی‌شنی است که نشان‌دهنده ظرفیت بالقوه بالاتر آن برای ایجاد پیوندهای سطحی و تشکیل کمپلکس با نانوذرات می‌باشد. اسیدیته هر دو خاک در محدوده خنثی تا کمی قلیایی (۷/۶۶ و ۷/۷) قرار داشته و تفاوت فاحشی از این حیث نشان نمی‌دهند.

جدول ۱. برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه (لومی‌شنی و رسی)

ویژگی‌ها	خاک لومی‌شنی (Sandy Loam)	خاک رسی (Clay)
شن (درصد)	۵۸/۲	۱۸/۲
سیلت (درصد)	۲۲	۳۲
رس (درصد)	۱۹/۸	۴۹/۸
کربن آلی (درصد)	۰/۷۰	۱/۳۷
pH	۷/۶۶	۷/۷

مقایسه پتانسیل پایه فعالیت آنزیمی در دو بافت خاک

پیش از بررسی اثرات متقابل غلظت نانوقره و زمان انکوباسیون، پتانسیل پایه و بیولوژیک دو بستر خاکی با استفاده از آزمون تی مستقل مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲ و شکل ۱). به منظور جلوگیری از تداخل اثرات تنش آلاینده با ویژگی‌های ذاتی خاک، این مقایسه آماری صرفاً بر روی میانگین داده‌های تیمار شاهد (بدون حضور نانوقره) انجام پذیرفت. نتایج حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در پتانسیل بیوشیمیایی اولیه دو بافت خاک بود.

میانگین فعالیت پایه آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی در خاک با بافت لومی‌شنی به‌طور معنی‌داری بالاتر از خاک رسی ثبت شد. در نقطه مقابل، بررسی آنزیم فسفاتاز اسیدی نشان داد که میانگین فعالیت ذاتی این آنزیم در خاک سنگین رسی به‌طور بسیار معنی‌داری از خاک لومی‌شنی فراتر رفته است. این برتری آماری در فسفاتاز اسیدی می‌تواند به‌واسطه محتوای بالاتر کربن آلی در خاک رسی و نقش حمایتی کلوئیدها در حفظ و تثبیت این آنزیم خارج‌سلولی باشد. از سوی دیگر، پایین‌تر بودن فعالیت ظاهری پایه برای اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی در خاک رسی را می‌توان به جذب سطحی شدید و تثبیت بسیار محکم این آنزیم‌ها توسط کانی‌های رس و ترکیبات هوموسی نسبت داد؛ این تثبیت فیزیکوشیمیایی قوی با ایجاد ممانعت فضایی^۱ و محدود کردن نفوذپذیری سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم، سرعت واکنش کاتالیزوری را در حالت پایه کاهش می‌دهد، در حالی که در خاک لومی‌شنی به دلیل فقر کلوئیدی، دسترسی سوبسترا به آنزیم بسیار آزادانه‌تر صورت می‌گیرد. شکل ۱ نیز با ارائه هیستوگرام توزیع داده‌ها، تفاوت بارز در دامنه و پراکندگی فعالیت آنزیمی را در این دو بستر متفاوت اکولوژیک به‌خوبی به تصویر می‌کشد.

جدول ۲. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های خاک در مواجهه با نانوذرات نقره در دو بافت لومی‌شنی و رسی (آزمون تی مستقل)

نام آنزیم	مکان نمونه‌برداری	بافت خاک	میانگین	انحراف معیار	خطای معیار	آماره تی	درجه آزادی	معنی‌داری سطح P-)	تفاوت میانگین‌ها	فاصله اطمینان ۹۵٪
اوره‌آز	چیتگر	رسی	۵۴/۵	۳۲/۶	۵/۴	-۲/۶۲	۶۸	۰/۰۱۱	**۲۱/۷۵	(-۳۸/۳۲، -۵/۱۸)
	کرج	لومی‌شنی	۷۶/۳	۳۷/۷	۶/۳					
فسفاتاز اسیدی	چیتگر	رسی	۵۶۸	۱۸۹	۳۱	۴/۹۵	۶۸	۰/۰۰۰	**۲۰۴/۱	(۱۲۱/۹، ۲۸۶/۳)
	کرج	لومی‌شنی	۳۶۳	۱۶۰	۲۷					
فسفاتاز قلیایی	چیتگر	رسی	۶۸۹	۱۸۵	۳۱	-۷/۱۳	۶۵	۰/۰۰۰	**۳۶۲/۹	(-۴۶۴/۵، -۲۶۱/۲)
	کرج	لومی‌شنی	۱۰۵۲	۲۴۳	۴۰					



شکل ۱. مقایسه و توزیع داده‌های فعالیت آنزیمی در دو نوع خاک؛ الف) تست معنی‌داری تفاوت میانگین‌ها، ب) نمودار هیستوگرام پراکندگی داده‌ها در دو خاک لومی‌شنی و رسی

بررسی اثرات اصلی و متقابل تیمارها بر پویایی آنزیم‌های خاک

نتایج تجزیه واریانس سه‌عاملی (تأثیر فاکتورهای بافت خاک، زمان انکوباسیون، غلظت نانوذرات نقره و اثرات متقابل آن‌ها) بر فعالیت آنزیم‌های خاک در جدول ۳ ارائه شده است. بر اساس این نتایج، اثر اصلی بافت خاک بر فعالیت هر سه آنزیم در سطح احتمال ۱ درصد بسیار معنی‌دار بود که نشان‌دهنده تفاوت‌های ذاتی و ظرفیت بافری متفاوت دو بستر اکولوژیک است. در خصوص آنزیم اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی، نتایج نشان داد که اثرات متقابل سه‌گانه (بافت $\times$ زمان $\times$ سطح نانوذره) به ترتیب در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار گردید. معنی‌دار شدن این اثر متقابل اثبات می‌کند که میزان بازدارندگی نانوذرات نقره یک روند ایستا نیست، بلکه فرآیندی کاملاً پویاست که شدت آن بسته به نوع بافت خاک و با گذشت زمان (اثر پیرشدگی آلاینده) تغییر می‌کند. بررسی داده‌های مربوط به آنزیم فسفاتاز اسیدی حاکی از واکنش‌های متفاوت در دو ماتریس حاکی است. معنی‌داری اثر متقابل سه‌گانه برای این آنزیم در سطح ۱ درصد، نشان می‌دهد که حضور مقادیر بالای کلوئیدها در خاک رسی باعث ایجاد نوسانات و پاسخ‌های پیچیده‌تر و وابسته به زمان در مهار این آنزیم نسبت به خاک لومی‌شنی شده است.

جدول ۳. جدول آنالیز واریانس صفات اندازه‌گیری شده برای نانو ذرات نقره

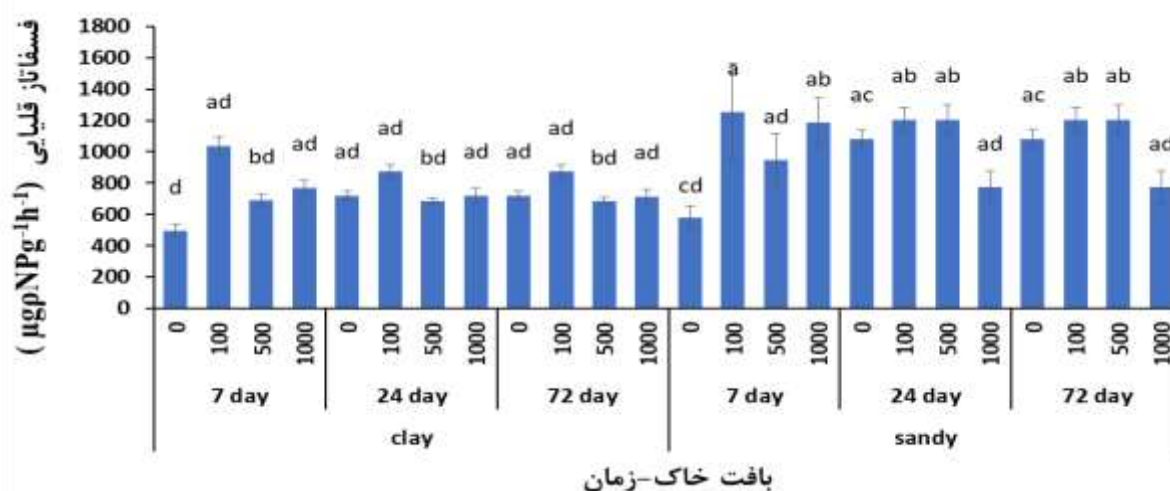
منبع تغییرات	درجه آزادی	فعالیت آنزیم اوره‌آز	فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی	فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی	میانگین مربعات
بافت خاک	۱	۱۳۱۰ *	۴۹۶۳۶۱ **	۱۲۳۶۳۰۶ **	
زمان	۲	۵۸۴۷ **	۱۵۰۷۰۰ **	۱۱۴۱۲ ns	
سطح نانوذره	۳	۶۴۲۳ **	۲۲۳۲۴ ns	۱۱۴۱۲ **	
بافت $\times$ زمان	۲	۳۰۶۰ **	۹۸۲۸۲ **	۱۰۸۳۸ ns	
بافت $\times$ سطح نانوذره	۳	۵۰۲ ns	۳۹۲۲۵ ns	۵۰۳۶۸ ns	
زمان $\times$ سطح نانوذره	۶	۲۸۵۴ **	۱۱۲۰۳۴ **	۱۳۸۶۱۱ **	
بافت $\times$ زمان $\times$ سطح نانوذره	۶	۷۴۹ **	۱۰۸۱۳۵ **	۴۴۵۶۱۲ **	
خطا	۴۸	۲۷۷	۱۷۴۵۴	۲۹۷۸۹	
ضریب تغییرات	۶/۱۱	۵/۲۲	۸/۹۵		

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح ۵٪ و ۱٪ احتمال آماری، ns معنی دار نیست.

پاسخ وابسته به دوز و دینامیک زمانی آنزیم‌ها در خاک با بافت لومی‌شنی

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک لومی‌شنی حاکی از یک پاسخ تحریکی قوی (هورمسیس) در روزهای اولیه مواجهه با نانوذرات نقره است. در روز هفتم انکوباسیون، افزودن ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نانونقره منجر به یک جهش خیره‌کننده و افزایش ۱۱۵ درصدی فعالیت آنزیم (ثبت ۱۲۵۲ میکروگرم بر گرم در ساعت در مقابل ۵۸۱ واحد در شاهد) گردید. این روند تحریکی در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم نیز با افزایش ۱۰۴ درصدی نسبت به شاهد تداوم یافت. با پیشروی زمان و در مقطع ۲۴ روزه، پتانسیل پایه فعالیت در تیمار شاهد به ۱۰۸۳ واحد افزایش یافت. در این مقطع، تیمار ۱۰۰ میلی گرم همچنان افزایشی ۱۱ درصدی را نشان داد، اما غلظت حداکثری ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، مقاومت بیوشیمیایی را در هم شکسته و باعث افت ۲۹ درصدی فعالیت آنزیم گردید. روند مشاهده‌شده در روز ۲۴ با ثبات بالایی تا انتهای دوره آزمایش (روز ۷۲) در این بافت حفظ گردید.

در مقابل، بررسی تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک با بافت رسی، پرده از نقش بسیار مهم و بافری کلوئیدهای خاک در مواجهه با نانوذرات نقره برمی‌دارد. برخلاف روند بازدارنده مورد انتظار، حضور نانونقره در این بستر منجر به تحریک واکنش‌های جبرانی شد. در روز هفتم انکوباسیون، افزودن ۱۰۰ میلی گرم نانونقره یک شوک هورمسیس بی‌نظیر ایجاد کرد و باعث جهش ۱۰۹ درصدی فعالیت آنزیم (رسیدن از ۴۹۶ واحد در شاهد به ۱۰۳۸ واحد) گردید. در این زمان حتی غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم نیز افزایش ۵۵ درصدی را به همراه داشت. با گذشت زمان و وقوع اثر پیرشدگی (روزهای ۲۴ و ۷۲)، دینامیک فعالیت آنزیم از حالت شوک حاد خارج شده و به ثبات رسید؛ به‌نحوی که غلظت ۱۰۰ میلی گرم در این مقاطع زمانی افزایشی متعادل و پایدار معادل ۲۱ درصد نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۲).

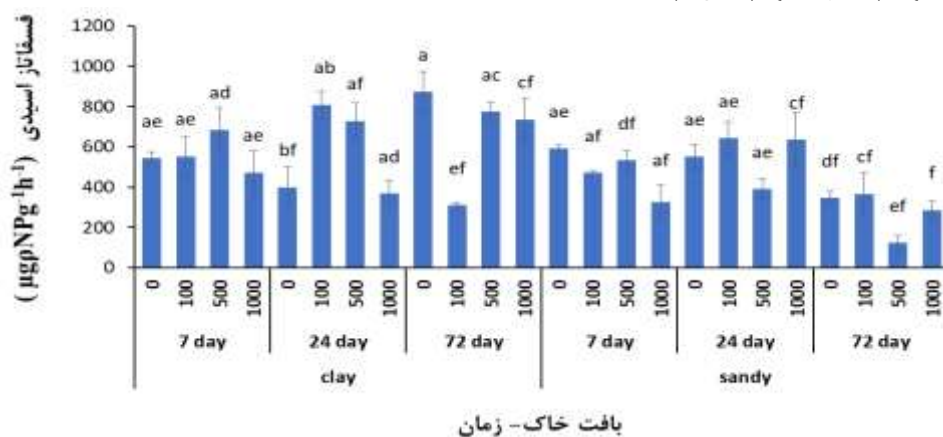


شکل ۲. اثر متقابل زمان انکوباسیون (پیرشدگی)، سطح نانوذرات نقره و بافت خاک بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (حروف متفاوت لاتین روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد. میله‌های خطا (Error bars) نیز بیانگر انحراف معیار داده‌ها هستند).

پاسخ وابسته به دوز و دینامیک زمانی آنزیم فسفاتاز اسیدی در دو بافت خاک

روند تغییرات آنزیم فسفاتاز اسیدی در خاک لومی‌شنی، آسیب‌پذیری بالاتر این آنزیم را به تصویر می‌کشد. در مقطع زمانی ۷ روزه، پتانسیل پایه تیمار شاهد ۵۹۲ واحد بود. اعمال غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوقره منجر به افت شدید ۴۵ درصدی این فعالیت (سقوط به ۳۲۷ واحد) گردید. با رسیدن به انتهای دوره آزمایش (روز ۷۲)، اثرات پیرشدگی و تخلیه سوبسترا باعث کاهش پتانسیل کاتالیزوری پایه در تیمار شاهد (به ۳۴۶ واحد) شد. در این مرحله، غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم شدیدترین بازدارندگی را اعمال کرده و با ثبت تنها ۱۲۲ واحد، افت شدید ۶۵ درصدی را نسبت به شاهد تضعیف‌شده به همراه داشت.

از سوی دیگر، بررسی روند تغییرات آنزیم فسفاتاز اسیدی در خاک سنگین (رسی) حاکی از رفتار نوسانی و تطبیق‌پذیری جوامع میکروبی است. در روز هفتم، فعالیت تیمار شاهد ۵۴۴ واحد ثبت شد و اعمال غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم باعث افت ۱۳ درصدی فعالیت گردید. با رسیدن به مقطع ۲۴ روزه، واکنش‌های بازیابی قابل‌توجهی در بستر رسی رخ داد. در این مقطع، تیمارهای ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم با ثبت مقادیر ۸۰۹ و ۷۲۹ واحد، به‌ترتیب جهش ۱۰۲ و ۸۲ درصدی را تجربه کردند. شگفت‌انگیزتر آنکه در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم، اثر بازدارندگی آلاینده تا حد زیادی خنثی شد و فعالیت آنزیم به فاصله ۸ درصدی تیمار شاهد (۴۰۰ واحد) رسید. با این وجود، در انتهای دوره (روز ۷۲)، اثرات تجمعی آلاینده باعث شد مقاومت بافری خاک در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم مجدداً شکسته شده و فعالیت آنزیم با افت ۱۶ درصدی نسبت به شاهد (۸۷۴ واحد) همراه شود (شکل ۳).

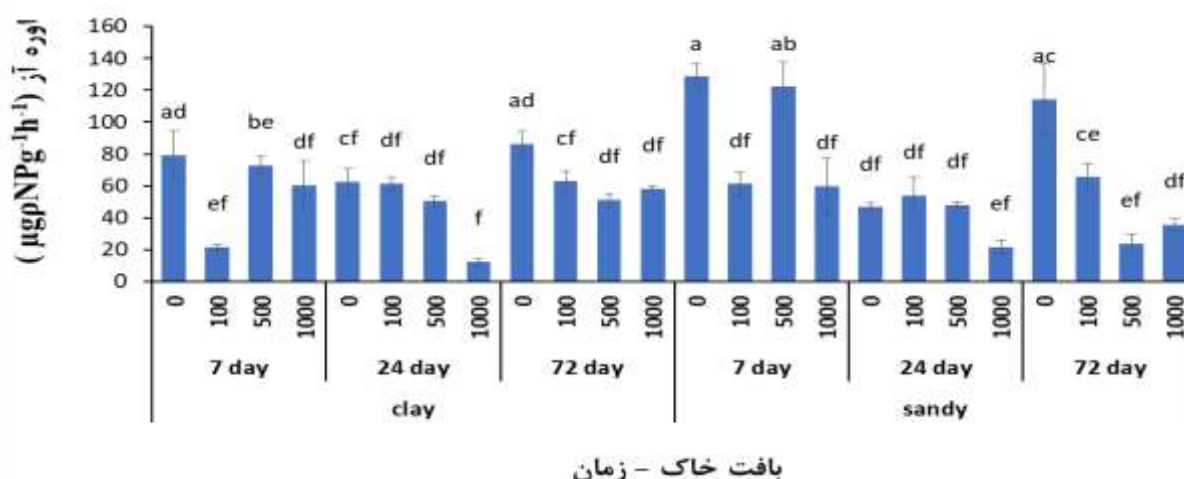


شکل ۳. اثر متقابل زمان انکوباسیون، سطح نانوذرات نقره و بافت خاک بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی (حروف متفاوت لاتین روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد. میله‌های خطا (Error bars) نیز بیانگر انحراف معیار داده‌ها هستند).

پاسخ وابسته به دوز و دینامیک زمانی آنزیم اوره‌آز در دو بافت خاک

در میان شاخص‌های بیوشیمیایی مورد مطالعه، آنزیم اوره‌آز در خاک لومی‌شنی واکنش بازدارنده وابسته به دوز بسیار واضحی را از خود نشان داد. در روز هفتم، پتانسیل پایه فعالیت اوره‌آز ۱۲۹ واحد بود. افزودن ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانونقره منجر به کاهش شدید و همسان ۵۳ تا ۵۴ درصدی این فعالیت (ثبت ۶۱ و ۶۰ واحد) گردید. این اثر سرکوب‌گرانه در مقطع ۲۴ روزه نیز در دوزهای بالا تداوم یافت و کاربرد ۱۰۰۰ میلی‌گرم نانونقره افت ۵۴ درصدی را تثبیت کرد. در انتهای دوره (روز ۷۲)، غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ترشح آنزیم را به شدت مختل کرده و به ترتیب افت ۷۹ درصد و ۶۹ درصدی را نسبت به شاهد (۱۱۴ واحد) تحمیل نمودند که نشان‌دهنده توقف تقریبی چرخه نیتروژن در خاک‌های سبک فاقد کلئیدهای محافظ است.

در نقطه مقابل، پویایی آنزیم اوره‌آز در خاک رسی، نمایانگر تقابل استرس آلاینده و ظرفیت بافری خاک است. در روز هفتم انکوباسیون، اعمال غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانونقره شوک اولیه‌ای معادل ۷۳ درصد کاهش فعالیت نسبت به شاهد (۷۹ واحد) وارد نمود. در مقطع ۲۴ روزه، با کاهش سطح کاتالیزوری پایه، غلظت‌های بالای آلاینده همچنان فشار شدیدی وارد کردند؛ به‌طوری‌که تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم افت ۸۰ درصدی را ثبت نمود. در انتهای دوره (روز ۷۲)، پایداری کلئیدهای رسی توانست بخشی از سمیت را مهار کند؛ در این زمان، در مقایسه با شاهد (۸۶ واحد)، غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم نانونقره به ترتیب افت ۲۷، ۴۱ و ۳۲ درصدی را نشان دادند که در مقایسه با تخریب ۸۰ درصدی اوره‌آز در خاک لومی‌شنی، اثبات‌کننده ظرفیت بافری بالاتر کانی‌های رس در مهار نسبی سمیت طولانی‌مدت است (شکل ۴).



شکل ۴. اثر متقابل زمان انکوباسیون، سطح نانوذرات نقره و بافت خاک بر فعالیت آنزیم اوره‌آز (حروف متفاوت لاتین روی ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد. میله‌های خطا (Error bars) نیز بیانگر انحراف معیار داده‌ها هستند).

بحث

تحلیل مکانیسمی سمیت نانوذرات نقره بر کاتالیزورهای زیستی خاک

نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات نقره نقش زیادی در مهار فعالیت‌های آنزیمی خاک دارند، هرچند شدت این بازدارندگی بسته به نوع آنزیم متفاوت بود. مکانیسم اصلی سمیت این نانوذرات در محیط‌های متخلخل خاک را می‌توان به دو فرآیند اصلی نسبت داد: آزادسازی یون‌های نقره ناشی از اکسیداسیون سطحی و القای استرس اکسیداتیو. نانوذرات نقره پس از ورود به فاز محلول خاک، تحت تأثیر فرآیند انحلال اکسیداتیو قرار گرفته و یون‌های نقره آزاد می‌کنند. این کاتیون‌ها به دلیل اندازه کوچک و واکنش‌پذیری بالا، به راحتی در ماتریس خاک جابه‌جا شده و با جایگاه‌های فعال آنزیم‌ها برهمکنش می‌دهند. باید توجه داشت که سمیت اکولوژیک مشاهده‌شده در این پژوهش، برآیندی از اثرات مستقیم خود نانوذرات (Particle-specific effects) و سمیت ناشی از یون‌های نقره (Ag^+) آزادشده در محیط است. تفکیک دقیق سهم هر یک از این دو مکانیسم نیازمند مطالعات تکمیلی با استفاده از غشاهای دیالیز یا تیمارهای مقایسه‌ای نترات نقره می‌باشد.

یکی از کلیدی‌ترین جنبه‌های سمیت نقره، میل ترکیبی شدید و اختصاصی یون‌های نقره با گروه‌های عاملی پروتئین‌ها، به‌ویژه

گروه‌های تیول موجود در اسیدهای آمینه نظیر سیستئین است. این پیوند قوی منجر به تشکیل پیوندهای S-Ag پایدار می‌شود که ساختار سوم و چهارم پروتئین آنزیم را تغییر داده و با مسدود کردن جایگاه کاتالیزوری، مانع از اتصال سوسترها به آنزیم می‌گردد. علاوه بر سمیت یونی، نانوذرات نقره از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم نظیر تولید گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل، منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو در جوامع میکروبی ترشح‌کننده آنزیم می‌شوند. این فرآیند با تخریب غشای سلولی و پراکسیداسیون لیپیدی، نه تنها بقای میکروارگانیسم‌ها را به خطر می‌اندازد، بلکه فرآیند سنتز و ترشح آنزیم‌های خارج سلولی جدید را نیز مختل می‌کند.

در این مطالعه، حساسیت آنزیم اوره‌آز به نانونقره به‌طور معنی‌داری بیشتر از آنزیم‌های فسفاتاز (به‌ویژه در خاک لومی‌شنی) مشاهده شد. این تفاوت در پاسخ بیوشیمیایی را می‌توان با ساختار منحصر به فرد این آنزیم‌ها تبیین کرد. اوره‌آز یک متالوآنزیم وابسته به نیکل است که در مرکز فعال خود دارای یک زبانه انعطاف‌پذیر حاوی بقایای سیستئین می‌باشد. یون‌های نقره به دلیل شعاع یونی مشابه و تمایل الکترون‌خواهی بالاتر، می‌توانند با جایگزینی یون‌های نیکل در جایگاه فعال یا برهم‌کنش مستقیم با گروه‌های تیول در ساختار زبانه اوره‌آز، عملکرد کاتالیزوری آن را به کلی متوقف کنند. این حساسیت شدید اوره‌آز در مطالعات (Kim et al., 2013) نیز تأیید شده است که نانوذرات فلزی را بازدارنده‌های بسیار قوی برای چرخه نیتروژن در مقایسه با سایر آنزیم‌ها معرفی کرده‌اند.

در مقابل، آنزیم‌های فسفاتاز (اسیدی و بازی) پایداری نسبی بیشتری نشان دادند. فسفاتازها به دلیل منشأ متنوع (گیاهی و میکروبی) وجود ایزوآنزیم‌های مختلف، ممکن است مکانیسم‌های تطبیقی متفاوتی برای مقابله با تنش فلزی داشته باشند. همچنین، ساختار فضایی جایگاه فعال فسفاتازها به گونه‌ای است که گروه‌های حساس به نقره کمتر در معرض تماس مستقیم قرار دارند. پدیده هورمیسس (تحریک فعالیت در اثر تنش) مشاهده شده در فعالیت فسفاتاز قلیایی (افزایش فعالیت در غلظت‌های پایین یا مقاطع زمانی خاص) نشان‌دهنده واکنش‌های دفاعی میکروارگانیسم‌ها برای غلبه بر تنش اولیه است که طی آن با ترشح بیشتر آنزیم، تلاش می‌کنند متابولیسم فسفر را در شرایط آلودگی حفظ کنند. با این وجود، باید تأکید کرد که این جهش شدید فعالیت لزوماً به معنای وضعیت سالم و مطلوب برای خاک نیست؛ بلکه نشانه‌ای از یک پاسخ اضطراری و استرس‌زایی در جوامع میکروبی جهت حفظ متابولیسم فسفر برای بقا است. این واکنش جبرانی با صرف انرژی متابولیک بسیار بالایی همراه است و همان‌طور که در روندهای روز ۷۲ مشاهده گردید، تداوم آن می‌تواند در بلندمدت منجر به خستگی سیستم بیولوژیک و افت عملکرد اکوسیستم خاک گردد (Zhang et al., 2023; Wu et al., 2023).

اثرات تعدیل‌کنندگی ماتریس خاک؛ تقابل بافت سبک و سنگین

یافته‌های این پژوهش نشان داد که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی بستر خاک، به‌ویژه بافت و محتوای ماده آلی، نقش تعیین‌کننده‌ای در سرنوشت و سمیت اکولوژیک نانوذرات نقره ایفا می‌کنند. تضاد فاحش میان واکنش آنزیم‌ها در دو خاک مورد مطالعه را می‌توان به تفاوت در ظرفیت بافری و پتانسیل جذبی آن‌ها نسبت داد. در خاک با بافت لومی‌شنی که دارای مقدار اندک رس (۱۹/۸ درصد) و کربن آلی بسیار پایین (۰/۷ درصد) بود، بازدارندگی شدیدی به‌ویژه در مورد آنزیم اوره‌آز مشاهده شد. در مقابل، خاک رسی با دارا بودن ۴۹/۸ درصد رس و ۱/۳۷ درصد ماده آلی، پایداری کاتالیزوری بالاتری نشان داد و حتی در غلظت‌های بالای نانونقره، اثرات تحریکی در آن ثبت گردید.

نقش حفاظتی خاک رسی در برابر سمیت نانونقره ناشی از سطح ویژه بسیار بالا و بار منفی کانی‌های رس است. ذرات رس می‌توانند از طریق جذب سطحی فیزیکی (نیروهای واندروالس) و برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک، نانوذرات نقره و کاتیون‌های نقره آزاد شده را بر روی سطوح خود تثبیت کنند. این فرآیند منجر به کاهش چشمگیر زیست‌فراهمی آلاینده در محلول خاک شده و از تماس مستقیم یون‌های سمی با غشای سلولی ریزجانداران و جایگاه‌های فعال آنزیم‌های خارج سلولی جلوگیری می‌کند. در حالی که در خاک لومی‌شنی به دلیل فقر جایگاه‌های اتصال، بخش عمده نانوذرات به‌صورت معلق و فعال در فاز محلول باقی مانده و سمیت حادی را اعمال کرده‌اند.

علاوه بر کانی‌های رس، کربن آلی موجود در خاک سنگین نقش حیاتی در کلاته‌سازی نقره ایفا می‌کنند. مواد آلی خاک دارای گروه‌های عاملی متنوعی نظیر کربوکسیل، هیدروکسیل و به‌ویژه تیول هستند که تمایل فوق‌العاده‌ای به تشکیل کمپلکس‌های پایدار با یون‌های نقره دارند. تشکیل این کمپلکس‌های آلی-فلزی نه تنها تحرک نقره را در ماتریس خاک محدود می‌کند، بلکه با پوشش‌دهی سطح نانوذرات، مانع از انحلال سریع اکسیداتیو آن‌ها و آزادسازی یون‌های سمی بیشتر می‌شود. این مکانیسم توجیه‌کننده پایداری آنزیم‌های فسفاتاز در خاک رسی و ثبت بیشترین میزان فعالیت اوره‌آز در غلظت‌های بالای نانونقره در این بستر نسبت به خاک لومی‌شنی است.

نتایج این بخش همسو با مطالعات Cornelis et al. (۲۰۱۴) است که تأکید کردند خاک‌های غنی از کلئید، پتانسیل بالایی در

کاهش سمیت نانومواد مهندسی شده دارند. همچنین، Josko et al. (۲۰۱۴) گزارش کردند که خاک‌های با بافت سنگین به دلیل تشکیل کمپلکس‌های رس-نانوذره-آنزیم، می‌توانند از دنا توره شدن پروتئین‌ها جلوگیری کرده و پایداری کاتالیزوری آنزیم‌ها را در شرایط تنش فلزی افزایش دهند. به طور کلی، می‌توان استنباط کرد که در اکوسیستم‌های خاکی با بافت سبک، ریسک اکولوژیک نانوذرات نقره بسیار بالاتر است. با این وجود، نباید خاک‌های سنگین را کاملاً «ایمن» تلقی کرد؛ این خاک‌ها تنها دارای «مقاومت و ظرفیت بافری اولیه» بالاتری هستند، اما همان‌طور که نتایج روز ۷۲ نشان داد، در درازمدت و در مواجهه با غلظت‌های بالا، سد حفاظتی آن‌ها نیز شکسته شده و دچار سمیت مزمن می‌گردند. پایش سلامت خاک در مناطق آلوده به پسماندهای نانو، مستقل از نوع بافت، از اهمیت و حساسیت بالایی برخوردار است.

دینامیک زمانی (پیرشدگی آلاینده) و پاسخ‌های اکولوژیک جوامع میکروبی

نتایج این پژوهش به روشنی اثبات کرد که سمیت اکولوژیک نانوذرات نقره یک پدیده استاتیک نبوده و با گذشت زمان (پیرشدگی) دستخوش تغییرات بنیادین می‌شود. این دینامیک زمانی تابعی از واکنش‌های فیزیکوشیمیایی پیچیده در ماتریس خاک نظیر کلوخه‌ای شدن، ترسیب و تغییر در زیست‌فراهمی یون‌های نقره است.

در مراحل اولیه مواجهه (روز ۷)، پدیده هورمسیس به‌ویژه در خاک با بافت سنگین (رسی) مشاهده شد. برای نمونه، افزایش ۸۲ درصدی فعالیت فسفاتاز قلیایی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به شاهد، نشان‌دهنده واکنش جبرانی جوامع میکروبی به تنش اولیه است. طبق نظریه‌های اکوتوکسیکولوژی، مقادیر اندک یا متوسط یک عامل تنش‌زا می‌تواند با تحریک مکانیسم‌های دفاعی و ترمیمی در ریزجانداران، منجر به افزایش موقت فعالیت‌های متابولیکی و ترشح آنزیم‌های خارج سلولی گردد.

در مقطع میان‌مدت (روز ۲۴)، شاهد تلاش جوامع میکروبی برای بازیابی توان کاتالیزوری بودیم. این وضعیت به‌وضوح در آنزیم فسفاتاز اسیدی و اوره‌آز در خاک رسی نمایان گشت؛ جایی که افت اولیه سمیت جبران شد و سطح فعالیت آنزیم‌ها به تیمار شاهد نزدیک گردید. این پدیده را می‌توان به فرآیند پیرشدگی آلاینده نسبت داد. با گذشت زمان، نانوذرات نقره تحت تأثیر کلوئیدهای رس و مواد آلی دچار کلاته‌سازی شده و یا با تبدیل شدن به ترکیبات نامحلول نظیر سولفید نقره، از فاز محلول خارج می‌شوند. این کاهش در زیست‌فراهمی یون‌های آزاد نقره، فشار محیطی را از روی میکروب‌ها برداشته و فرصت بازسازی جمعیت و ترشح مجدد آنزیم‌ها را فراهم می‌کند.

با این وجود، در درازمدت (روز ۷۲)، اثرات تجمعی و مخرب آلاینده مجدداً بر مکانیسم‌های سازگاری غلبه کرد. افت شدید فعالیت اوره‌آز در خاک لومی‌شنی تا مرز توقف کامل در انتهای دوره، نشان‌دهنده ناتوانی سیستم بیولوژیک در بازگشت به حالت اولیه در بستر فاقد ظرفیت بافری است. حتی در خاک رسی نیز، غلظت‌های حداکثری نانونقره (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در نهایت منجر به شکست پایداری آنزیم‌ها در روز ۷۲ گردید. این سمیت تأخیری می‌تواند ناشی از انحلال تدریجی نانوذرات از هسته مرکزی و آزادسازی مستمر گونه‌های فعال اکسیژن باشد که در درازمدت منجر به آسیب‌های جبران‌ناپذیر به غشای سلولی و تخریب ساختار پروتئین‌های آنزیمی شده است.

در مجموع، تفاوت رفتار زمانی نانونقره در دو بافت خاک نشان داد که در خاک‌های سبک، پیرشدگی آلاینده منجر به سمیت مزمن و پایدار می‌شود، در حالی که در خاک‌های سنگین، این فرآیند با یک دوره بازیابی میان‌مدت همراه است که البته در دوزهای بالا، ریسک اکولوژیک همچنان در بلندمدت باقی می‌ماند.

با وجود نتایج و الگوهای به‌دست‌آمده، باید اذعان داشت که ارزیابی اثرات اکوتوکسیکولوژیک تنها بر اساس شاخص‌های آنزیمی دارای محدودیت‌هایی است. اگرچه آنزیم‌های مورد مطالعه نماینده‌های بسیار حساسی از چرخه‌های نیتروژن و فسفر هستند، اما برای قضاوت قطعی در خصوص مکانیسم دقیق سمیت و تفکیک کامل اثر نانوذره از یون آزاد نقره، کافی نیستند. همچنین عدم سنجش شاخص‌هایی نظیر تنفس پایه میکروبی و آنزیم دهیدروژناز از محدودیت‌های این پژوهش به شمار می‌رود. لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات تکمیلی آتی، پایش فعالیت‌های آنزیمی در کنار سنجش بیومس میکروبی و اندازه‌گیری مستقیم غلظت یون نقره آزاد شده صورت پذیرد تا تصویری جامع‌تر از ماهیت سمیت ارائه گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ورود نانوذرات نقره به اکوسیستم خاک، تهدیدی جدی و در عین حال پیچیده برای سلامت بیوشیمیایی بستر محسوب می‌شود. بر اساس یافته‌ها، سمیت اکولوژیک این نانوذرات بر فعالیت‌های آنزیمی خاک، تحت تأثیر سه فاکتور کلیدی شامل نوع آنزیم، ویژگی‌های بافتی ماتریس خاک و مدت زمان تماس قرار دارد. یافته‌های آماری اثبات کرد که بافت خاک نقش



تعیین‌کننده‌ای در تعیین سرنوشت و شدت تنش نانونقره ایفا می‌کند؛ به‌طوری‌که خاک با بافت سبک (لومی‌شنی) به دلیل فقر کلوئیدی و ظرفیت بافری پایین، حساسیت اکولوژیک بسیار بالایی نشان داد و شدیدترین افت فعالیت‌های آنزیمی، به‌ویژه در مورد آنزیم اوره‌آز، در این بستر ثبت گردید. در مقابل، خاک با بافت رسی به واسطه محتوای بالاتر رس و ماده آلی، ظرفیت بافری بیشتری از خود نشان داد. با توجه به داده‌های کاتالیزوری به‌دست‌آمده، به نظر می‌رسد این کاهش فعالیت آلاینده در بافت سنگین، ناشی از مکانیسم‌های تثبیت فیزیکی، جذب سطحی و کلاته‌سازی باشد که زیست‌فراهمی نانونقره را کاهش داده است. اگرچه اثبات دقیق این مکانیسم‌ها نیازمند مطالعات تکمیلی است، اما پاسخ‌های آنزیمی در این پژوهش، تأییدکننده عملکرد بافری فاکتورهای خاک در مهار سمیت حاد می‌باشند.

از منظر شاخص‌های زیستی، آنزیم اوره‌آز حساس‌ترین پاسخ را به آلودگی نانونقره نشان داد که تأییدکننده آسیب‌پذیری چرخه نیتروژن در مواجهه با نانوذرات فلزی است. این در حالی است که آنزیم‌های فسفاتاز، به‌ویژه فسفاتاز قلیایی در خاک با بافت سنگین (رسی)، پایداری بیشتری نشان داده و حتی پدیده هورمسیس در آن‌ها مشاهده شد. همچنین، پایش زمانی ثابت کرد که سمیت نانونقره فرآیندی پویاست. باید در نظر داشت که روندهای زمانی مشاهده‌شده، صرفاً ناشی از پیرشدگی فیزیکوشیمیایی آلاینده نیستند، بلکه برآیندی یکپارچه از تغییرات در پایداری نانوذره و همچنین مکانیسم‌های سازگاری و واکنش‌های جبرانی جوامع میکروبی در گذر زمان می‌باشند. جوامع میکروبی در خاک‌های سنگین توانستند در میان‌مدت (روز ۲۴) بخشی از توان کاتالیزوری خود را بازیابی کنند. این بازیابی می‌تواند نتیجه سازگاری فیزیولوژیک و کاهش زیست‌فراهمی آلاینده به‌دلیل تبدیل نانونقره به فرم‌های نامحلول‌تر در گذر زمان باشد. اما در درازمدت (روز ۷۲) و در غلظت‌های حداکثری (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، اثرات تخریبی آلاینده بر مکانیسم‌های سازگاری غلبه کرد.

در نهایت، این مطالعه تأکید می‌کند که در ارزیابی ریسک زیست‌محیطی نانومواد، نباید تنها به غلظت آلاینده اکتفا کرد. اگرچه داده‌های آنزیمی این پژوهش برای تعیین دقیق آستانه‌های مقرراتی کافی نیستند، اما نتایج نشان می‌دهد که با توجه به پایداری اثرات سوء نانونقره در خاک‌های سبک، پیشنهاد می‌شود در تدوین پروتکل‌های کلان ارزیابی خطر پسماندهای نانو، ظرفیت بافری و بافت خاک منطقه دریافت‌کننده نیز به‌عنوان یک متغیر اثرگذار در نظر گرفته شود تا از زوال طولانی‌مدت حاصلخیزی خاک جلوگیری گردد.

ملاحظات اخلاقی

حامی مالی

مقاله حاضر با حمایت مالی و معنوی گروه خاکشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول انجام شد. دانشگاه در طراحی، جمع‌آوری، آنالیز اطلاعات و آماده‌سازی مقاله و ارسال آن نقشی نداشته است.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: دانشجو، تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها، انجام آزمایش و گردآوری داده‌ها، نوشتن پایان‌نامه
نویسنده دوم: استاد راهنمای پایان‌نامه، طراحی پژوهش، نظارت بر مراحل انجام پژوهش، بررسی و کنترل نتایج، اصلاح، بازبینی و نهایی سازی مقاله

نویسنده سوم: استاد مشاور پایان‌نامه، مشارکت در تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و آماده‌سازی مقاله

اعلامیه هوش مصنوعی مولد و فناوری‌های مبتنی بر هوش مصنوعی در فرایند نگارش

از هوش مصنوعی مولد و فناوری‌های مبتنی بر هوش مصنوعی در نگارش این مقاله استفاده نشده است.

بیانیه دسترسی به داده‌ها

داده‌های و نتایج مطالعه حاضر در اختیار نویسنده مسئول بوده و در صورت درخواست معقول قابل دسترسی است.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج بخاطر اجازه استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی ابراز می‌دارد.

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کلیه نویسندگان اصول اخلاقی را در طول انجام و انتشار این پژوهش علمی در نظر داشته‌اند.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

منابع

رضائی، شکوفه،، خامیرزایی، علی،، و شریفی گلرو، وحیده. (۱۴۰۵). مقایسه سمیت اکولوژیک نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل بر فعالیت‌های آنزیمی در دو خاک با بافت متفاوت. *نشریه زیست‌شناسی خاک*، ۱۴(۱)، ۶۱-۸۰.

REFERENCES

- Bamal, D., Singh, A., Chaudhary, G., Kumar, M., Singh, M., Rani, N., ... & Sehrawat, A. R. (2021). Silver nanoparticles biosynthesis, characterization, antimicrobial activities, applications, cytotoxicity and safety issues: An updated review. *Nanomaterials*, 11(8), 2086.
- Bazoobandi, A., Fotovat, A., Halajnia, A., & Philippe, A. (2022). Does the Nano Character and Type of Nano Silver Coating Affect Its Influence on Calcareous Soil Enzymes Activity?. *Coatings*, 12(12), 1968.
- Cornelis, G., Doolette, C., Thomas, M., McLaughlin, M., Kirby, J., Beak, D., & Chittleborough, D. (2012). Retention and dissolution of engineered silver nanoparticles in natural soils. *Soil Science Society of America Journal*, 76(3), 891-902.
- Cornelis, G., Hund-Rinke, K., Kuhlbusch, T., van den Brink, N., & Nickel, C. (2014). Fate and bioavailability of engineered nanoparticles in soils: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(24), 2720-2764.
- Courtois, P., Rorat, A., Lemiere, S., Guyoneaud, R., Attard, E., Levard, C., & Vandenbulcke, F. (2019). Ecotoxicology of silver nanoparticles and their derivatives introduced in soil with or without sewage sludge: A review of effects on microorganisms, plants and animals. *Environmental pollution*, 253, 578-598.
- Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1977). Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(5), 333-338.
- Gee, G. W., & Bauder, J. W. (1986). Particle-size analysis. In A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 1—Physical and Mineralogical Methods* (pp. 383-411). American Society of Agronomy.
- Grün, A. L., Manz, W., Kohl, Y. L., Meier, F., Straskraba, S., Jost, C., Emmerling, C. (2019). Impact of silver nanoparticles (AgNP) on soil microbial community depending on functionalization, concentration, exposure time, and soil texture. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1-17.
- Hänsch, M., & Emmerling, C. (2010). Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173(4), 554-558.
- Hochella Jr, M. F., Mogk, D. W., Ranville, J., Allen, I. C., Luther, G. W., Marr, L. C., ... & Yang, Y. (2019). Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system. *Science*, 363(6434), eaau8299.
- Hong, X., Song, Y., Cao, D., Xu, S., Gao, F., Fan, H., & Yao, H. (2025). Silver nanoparticles altered soil respiration, enzyme activity, carbon use efficiency and microbial community in an upland soil. *Applied Soil Ecology*, 211, 106128.
- Joško, I., Oleszczuk, P., & Futa, B. (2014). The effect of inorganic nanoparticles (ZnO, Cr₂O₃, CuO and Ni) and their bulk counterparts on enzyme activities in different soils. *Geoderma*, 232, 528-537.
- Kim, S., Sin, H., Lee, S., & Lee, I. (2013). Influence of metal oxide particles on soil enzyme activity and bioaccumulation of two plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1279-1286.
- Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V., & Brown Jr, G. E. (2012). Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental science and technology*, 46(13), 6900-6914.
- Mishra, P., Xue, Y., Eivazi, F., & Afrasiabi, Z. (2021). Size, concentration, coating, and exposure time effects of silver nanoparticles on the activities of selected soil enzymes. *Geoderma*, 381, 114682.
- Micuți, M. M., BĂDULESCU, L., & ISRAEL-ROMING, F. (2020). Soil enzymes-bioindicators of soil health. *Scientific Papers. Series B. Horticulture*, 64(1), 679.
- Nowack, B., Baalousha, M., Bornhöft, N., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Cotterill, J., & Mitrano, D. M. (2015). Progress towards the validation of modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials by analytical measurements. *Environmental Science: Nano*, 2(5), 421-428.
- Pareek, V., Gupta, R., & Panwar, J. (2018). Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. *Materials Science and Engineering: C*, 90, 739-749.



- Rahmatpour, S., Mosaddeghi, M. R., Shirvani, M., & 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.
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K., 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(6), 2295-2350.
- Rezaei, S., Khanmirzaei, A., & Sharifi Golro, V. (2026). Comparison of Ecotoxicity of Copper Oxide and Nickel Oxide Nanoparticles on Soil Enzyme Activities in Two Different Soil Textures. *Journal of Soil Biology*, 14(1), 61-80. <https://doi.org/10.22092/sbj.2026.371895.293>. (In Persian).
- Schultz, C. L., Gray, J., Verweij, R. A., Busquets-Fité, M., Puentes, V., Svendsen, C., ... & Matzke, M. (2018). Aging reduces the toxicity of pristine but not sulphidised silver nanoparticles to soil bacteria. *Environmental Science: Nano*, 5(11), 2618-2630.
- Sharma, R. K., Yadav, S., Dutta, S., Kale, H. B., Warkad, I. R., Zbořil, R., ... & Gawande, M. B. (2021). Silver nanomaterials: synthesis and (electro/photo) catalytic applications. *Chemical Society Reviews*, 50(20), 11293-11380.
- Temizel-Sekeryan, S., & Hicks, A. L. (2020). Global environmental impacts of silver nanoparticle production methods supported by life cycle assessment. *Resources, Conservation and Recycling*, 156, 104676.
- Thomas, G. W. (1996). Soil pH and soil acidity. In J. M. Bartels (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 3—Chemical Methods* (pp. 475-490). Soil Science Society of America.
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Durán, N., Diez, M. C., Martínez, M., Parada, J., & Seabra, A. B. (2020). Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *Journal of Hazardous Materials*, 390, 121974.
- Walkley, A., & 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.
- Wu, L., Ye, Y., Cai, Y., Ma, Y., Fan, T., & Liang, C. (2023). Environmental Effects of Surfactant-Free Silver Nanoparticles on Enzyme Activities, Bacterial Diversity, and Soil Function. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(8), 1685-1695.
- Wu, J., Zhai, Y., Liu, G., Bosker, T., Vijver, M. G., & Peijnenburg, W. J. (2021). Dissolution dynamics and accumulation of Ag nanoparticles in a microcosm consisting of a soil–lettuce–rhizosphere bacterial community. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(48), 16172-16181.
- Zantua, M. I., & Bremner, J. M. (1977). Stability of urease in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(2), 135-140.
- Zhang, Z., Lin, J., & Chen, Z. (2023). Predicting the effect of silver nanoparticles on soil enzyme activity using the machine learning method: type, size, dose and exposure time. *Journal of Hazardous Materials*, 457, 131789.
- Zhang, Z., Lin, J., Owens, G., & Chen, Z. (2024). Deciphering silver nanoparticles perturbation effects and risks for soil enzymes worldwide: Insights from machine learning and soil property integration. *Journal of Hazardous Materials*, 469, 134052.