

The effect of chitosan application on some microbial population and eco-physiological indices in a Pb contaminated soil

Nilufar Hassani¹, Setareh Amanifar^{*2}, Mahnaz Esteki³

1. M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: nilu.hasani@yahoo.com

2. Corresponding Author, Dept. of Soil Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: amanifar@znu.ac.ir

3. Dept. of Chemistry, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: m.esteki@znu.ac.ir

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 07.29.2021

Revised: 01.25.2022

Accepted: 02.06.2022

Keywords:

Biopolymer,
Carbon to nitrogen ratio of
microbial biomass,
Heavy metals,
Microbial community
structure

ABSTRACT

Background and Objectives: Contamination of agricultural soils with heavy metals is one of the major challenges worldwide. Heavy metal stress can affect soil living community and, consequently, different soil processes. The aim of this study was to evaluate the effect of chitosan application levels and soil contamination with Pb on soil biological activity.

Materials and Methods: In order to investigate the effects of different levels of Pb (non-contaminated (Pb0), 250 (Pb250) and 500 (Pb500) mg kg⁻¹ of soil) and chitosan application (without chitosan (Ch0), 0.6% (Ch0.6) and 1.2% (Ch1.2)) on the available Pb (DTPA-extractable Pb) and some biological properties in soil, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design. Different levels of lead and chitosan were added in pots containing 400 g of soil in three replications and soil moisture was maintained at 70% field capacity for 45 days. At the end of the incubation period, DTPA-extractable Pb and the population of microbial groups including heterotrophic bacteria, fungi, spore-forming bacteria and actinomycetes were determined. Moreover, microbial biomass of C (MBC) and N (MBN), basal respiration (BR) and substrate-induced respiration (SIR) were measured and some ecophysiological characteristics including microbial metabolic quotient (qCO₂), microbial respiration quotient (QR) and MBC:MBN ratio were evaluated.

Results: The results showed that Pb250 treatment did not show a significant effect on the population of the studied microbial groups compared to the control. Application of Pb500 treatment significantly reduced the population of spore-forming bacteria and actinomycetes but did not lead to a significant change in the faungi/bacteria ratio ($P \leq 0.05$). BR, SIR, MBC and MBN were significantly reduced in Pb500 treatment. Under Pb500 treatment, qCO₂, QR and MBC:MBN ratio increased. Application of chitosan at both levels decreased the available Pb concentration of lead in the soil so that application of 1.2% chitosan reduced DTPA-extractable Pb by 42% in Pb250 treatment and by 12% in Pb500 treatment. Application of chitosan increased BR, especially under Pb500 treatment, and caused a decrease in qCO₂ ($P \leq 0.05$).

Conclusion: It can be stated that the use of chitosan at low levels of soil pollution was more effective in reducing the Pb bioavailability. It also seems that the positive effects of the application of this biopolymer on

the biological properties of the soil have been partly due to its biodegradation in the studied soil. In general, the results indicate the importance of chitosan application as a biodegradable adsorbent to reduce available Pb in soil and its potential to enhance biological activity in Pb-contaminated soil.

Cite this article: Hassani, Nilufar, Amanifar, Setareh, Esteki, Mahnaz. 2022. The effect of chitosan application on some microbial population and eco-physiological indices in a Pb contaminated soil. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, 12 (1), 81-99.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/EJSMS.2022.19336.2035

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources



تأثیر کاربرد کیتوسان بر جمعیت برخی گروه‌های میکروبی و شناسه‌های اکوفیزیولوژیک در یک خاک آلوده به سرب

نیلوفر حسنی^۱، ستاره امانی‌فر^{۲*}، مهناز استکی^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: nilu.hasani@yahoo.com

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم خاک، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: amanifar@znu.ac.ir

۳. گروه شیمی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: m.esteki@znu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: آلودگی خاک‌های کشاورزی به فلزهای سنگین یکی از چالش‌های مهم در سراسر جهان است. جامعه زنده خاک و به دنبال آن فرآیندهایی که توسط این ریزجانداران کنترل می‌شود، از تنش فلزهای سنگین متأثر می‌شوند. هدف از این پژوهش ارزیابی تأثیر کاربرد سطوح کیتوسان و آلودگی خاک به سرب بر فعالیت زیستی خاک بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۷	
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵	مواد و روش‌ها: به منظور بررسی اثرات سطوح مختلف سرب (بدون آلودگی (Pb0)، ۲۵۰ (Pb250) و ۵۰۰ (Pb500) میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و کیتوسان (بدون کاربرد کیتوسان (Ch0)، ۰/۶٪ (Ch0.6) و ۱/۲٪ (Ch1.2)) بر غلظت سرب قابل جذب (سرب قابل استخراج با DTPA) و برخی ویژگی‌های زیستی خاک آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. در ظروف پلاستیکی سطوح مختلف سرب و کیتوسان به ۴۰۰ گرم خاک در سه تکرار افزوده شد و خاک‌ها در رطوبت ۷۰٪ ظرفیت زراعی به مدت ۴۵ روز خوابانده شدند. پس از پایان دوره خوابانیدن افزون بر تعیین غلظت سرب قابل استخراج با DTPA، جمعیت گروه‌های میکروبی مانند باکتری‌های هتروتروف، قارچ‌ها، باکتری‌های سازنده اسپور و اکتینومیسیت‌ها تعیین شد و کربن و نیتروژن زیتوده میکروبی، تنفس پایه و تنفس برانگیخته برآورد گردید. همین‌طور برخی شناسه‌های اکوفیزیولوژیک شامل ضریب متابولیک (qCO ₂)، ضریب تنفس میکروبی (QR) و نسبت کربن به نیتروژن زیتوده میکروبی (MBC:MBN) بررسی شد.
واژه‌های کلیدی: پلیمر زیستی، ساختار جامعه میکروبی، فلزهای سنگین، نسبت کربن به نیتروژن زیتوده میکروبی	
	یافته‌ها: کاربرد تیمار Pb250 اثر معنی‌داری بر جمعیت گروه‌های میکروبی بررسی شده در مقایسه با شاهد نشان نداد. کاربرد تیمار Pb500 به‌طور معنی‌داری سبب کاهش جمعیت

اکتینومیست‌ها و جمعیت باکتری‌های سازنده اسپور گردید ولی اثر معنی‌داری بر نسبت جمعیت قارچ به باکتری نداشت ($P \leq 0/05$). تنفس پایه و برانگیخته، کربن و نیتروژن زیتوده میکروبی در تیمار Pb500 به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. تیمار Pb500 ضریب متابولیک، ضریب تنفس میکروبی و نسبت MBC:MBN را افزایش داد. کاربرد کیتوسان در هر دو سطح سبب کاهش غلظت سرب قابل جذب در خاک گردید به‌طوری‌که کاربرد تیمار ۱/۲٪ کیتوسان زیست‌فرآهمی سرب را به میزان ۴۲٪ در تیمار Pb250 و به میزان ۱۲٪ در تیمار Pb500 کاهش داد. کاربرد کیتوسان تنفس پایه را به‌ویژه در تیمار Pb500 افزایش داد و سبب کاهش qCO_2 گردید ($P \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: می‌توان گفت که کاربرد کیتوسان در سطوح پایین آلودگی از نظر کاهش درصد زیست‌فرآهمی سرب کارآمدتر بود. هم‌چنین به نظر می‌رسد بخشی از آثار مثبت کاربرد این پلیمر زیستی بر ویژگی‌های زیستی خاک ناشی از تجزیه زیستی آن در خاک مورد مطالعه بوده است. به‌طورکلی نتایج نشان‌دهنده اهمیت کاربرد کیتوسان به عنوان یک جاذب زیست تجزیه‌پذیر برای کاهش غلظت سرب قابل جذب در خاک و پتانسیل آن برای تقویت فعالیت زیستی در خاک آلوده به سرب می‌باشد.

استناد: حسنی، نیلوفر، امانی‌فر، ستاره، استکی، مهناز (۱۴۰۱). تأثیر کاربرد کیتوسان بر جمعیت برخی گروه‌های میکروبی و شناسه‌های اکوفیزیولوژیک در یک خاک آلوده به سرب. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، ۱۲ (۱)، ۹۹-۸۱.

DOI: 10.22069/EJSMS.2022.19336.2035



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

دارای فلزهای سنگین، تصفیه آب و جداسازی یون‌های فلزی در هیدرومتالورژی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵). هم‌چنین کارایی استفاده از کیتوسان و کیتوسان‌های متقاطع به عنوان اصلاح‌کننده خاک برای پالایش خاک آلوده به فلزهای سنگین گزارش شده است (۶). البته باید توجه داشت که پایداری جاذب‌های تجزیه‌پذیر در خاک روشن نیست. برای این‌که چنین جاذب‌هایی کارآمد باشند، باید به گونه‌ای که بتوانند یون‌های فلزی را در مدت زمان قابل‌توجهی جذب کنند، در خاک پایدار بمانند. از سوی دیگر، افزودن جاذب تجزیه‌پذیر، فعالیت زیستی را تقویت می‌کند که می‌تواند در خاک‌های آلوده که سمیت فلزهای سنگین ممکن است عملکردهای میکروبی طبیعی را مهار کند، مهم باشد (۷).

تجزیه زیستی کیتوسان در شرایط خاک غیرآلوده و آلوده به فلزهای سنگین در یک مطالعه آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه زیستی کیتوسان و کیتوسان متقاطع تحت‌تأثیر فلزهای سنگین قرار گرفت و تأثیر روی در مهار فعالیت میکروبی بیش‌تر از مس و سرب بود (۸). پژوهش‌گران نشان دادند که روند کلی در پویایی ریزجانداران کیتینولیتیک خاک پس از افزودن بستره به صورت افزایش سریع جمعیت قارچ‌ها و باکتری‌های تند رشد است که با افزایش جمعیت اکتینومیست‌ها و قارچ‌های کند رشد دنبال می‌شود (۹). هم‌چنین پژوهش‌گران کاهش غلظت قابل‌جذب فلزهای سنگین هم‌چون کادمیم (۱۰) و نیکل (۱۱) و تقویت فعالیت زیستی خاک از جمله فعالیت‌های آنزیمی خاک را در اثر کاربرد کیتوسان در خاک‌های آلوده گزارش کرده‌اند (۱۰، ۱۱).

اثرات آلاینده‌ها در خاک می‌تواند بسیار گوناگون و شامل اثرات مستقیم بر ریزجانداران و اثرات غیرمستقیم که فرآیندهای بیوشیمیایی موجود در

آلودگی خاک و آب به فلزهای سنگین در سراسر جهان خطری جدی برای محیط زیست و سلامتی انسان به شمار می‌رود. توسعه فن‌آوری‌های نوآورانه پالایش فلزهای سنگین هم‌چنان یک چالش است، زیرا روش‌های کنونی کاستی‌های زیادی مانند گران بودن، تخریب ساختار خاک و مفید بودن در غلظت‌های ویژه را به همراه دارند. افزودن اصلاحگرها از جمله انواع پلیمرهای زیستی به خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین روشی کم‌هزینه برای پالایش درجای این خاک‌ها به‌شمار می‌آید. کاربرد پلیمرهای زیستی برای کلاته کردن یون‌های فلزی در خاک مزایای زیادی مانند سازگاری زیستی و تجزیه زیستی دارد و به این ترتیب منجر به ایمنی زیست محیطی می‌شود (۱). یکی از این پلیمرهای زیستی و به اصطلاح جاذب، کیتوسان است. کیتوسان، عمدتاً از زیرواحدهای β (۱، ۴) ۲-آمینو-۲-داکسی- β -D-گلوکز ساخته شده است که به طور طبیعی غنی از گروه‌های استامید $(-NHCOCH_3)$ و آمینو $(-NH_2)$ است که می‌تواند با یون‌های فلزی کمپلکس‌های پایداری را تشکیل دهد. کیتوسان با حذف اکثر گروه‌های استیل از کیتین با تیمار قلیایی قوی تولید می‌شود (۲). جذب یون‌های فلزهای واسطه توسط کیتوسان به احتمال زیاد از طریق کلات شدن و تشکیل کمپلکس کیتوسان-فلز اتفاق می‌افتد (۳). کیتوسان دارای ۶/۸۹٪ نیتروژن است و گروه‌های آمینو با یون‌های فلزی به شدت واکنش‌پذیر هستند (۴). در واقع اتم‌های نیتروژن دارای الکترون‌های آزاد هستند که می‌تواند با کاتیون‌های فلزی واکنش دهند. گروه‌های آمینو در ساختار کیتوسان با یون‌های فلزی زیادی مانند جیوه، نیکل، مس، کادمیوم، روی و سرب می‌تواند یک کلات پایدار ایجاد کنند و برای تیمار پساب‌های

شناخته شده و نسبت به سایر پارامترها از جمله کربن میکروبی یا کربن آلی خاک به تنهایی شاخص حساس تری است (۱۸). با افزایش تنش در محیط، ریزجانداران خاک انرژی بیشتری را از رشد به سمت پایداری تغییر می‌دهند و بنابراین نسبت تنفس پایه خاک^۳ (BR) به کربن زیتوده میکروبی (ضریب متابولیسی یا qCO_2) می‌تواند یک شاخص بسیار حساس تر برای آشکار ساختن سمیت فلزهای سنگین در شرایط طبیعی باشد (۱۲). در واقع ضریب متابولیسی نشان‌دهنده میزان کارایی جامعه میکروبی در استفاده از بستره می‌باشد. وضعیت جامعه میکروبی را می‌توان دقیقاً با ضریب تنفس میکروبی ارزیابی کرد که عبارت است از نسبت تنفس پایه خاک به تنفس ناشی از بستره^۴ (SIR) (۱۹).

در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین، آثار کاربرد کیتوسان بر فعالیت‌های میکروبی مهار شده توسط این فلزها در خاک کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین لازم است در کنار مطالعه توان پالایندگی این پلیمر زیستی، پیامدهای کاربرد آن بر فعالیت میکروبی طبیعی در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین نیز مورد توجه قرار گیرد. در اجرای این پژوهش فرض شده است که استفاده از سرب و جاذب تجزیه‌پذیر در خاک باعث اثرات چند سویه می‌شود به طوری که کیتوسان به عنوان جاذب تجزیه‌پذیر ضمن اثر بر غلظت قابل جذب سرب، فعالیت زیستی را تحریک می‌کند، در حالی که فلز سنگین سرب بر جامعه میکروبی خاک تأثیر منفی می‌گذارد. هدف از این پژوهش بررسی پیامدهای ناشی از ورود هم‌زمان کیتوسان و سرب به خاک بر جمعیت برخی گروه‌های میکروبی و شناسه‌های اکوفیزیولوژیک می‌باشد.

خاک‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند، باشند. تعدادی از پارامترهای میکروبیولوژیکی خاک، به عنوان مثال زیتوده میکروبی، ضریب متابولیک^۱ (qCO_2)، ضریب تنفسی میکروبی^۲ (QR) و فعالیت‌های آنزیمی برای تعیین کیفیت محیط زیست خاک مهم هستند (۱۲). تغییر در فعالیت‌های میکروبی خاک مانند زیتوده، تنفس و فعالیت متابولیک پاسخ مستقیم به کاربرد فلزهای سنگین است که در مطالعات پیشین گزارش شده است (۱۳، ۱۴). زیتوده میکروبی خاک عاملی مهم در تجزیه مواد آلی، چرخه عناصر غذایی و پایداری اکوسیستم است و به افزایش غلظت فلزهای سنگین در خاک حساس است. زیتوده میکروبی در خاک‌های آلوده به سطوح بالای فلزها کم‌تر از خاک‌های غیرآلوده است. سطح متوسط فلز در خاک ممکن است هیچ تأثیر قابل توجهی بر فرآیندهای میکروبی نداشته باشد یا حتی اثر تحریکی خفیفی نیز بر این فرآیندها نشان دهد (۱۵).

اندازه‌گیری زیتوده میکروبی لزوماً وضعیت متابولیسم ریزجانداران را منعکس نمی‌کند. از این رو، همراه با زیتوده میکروبی، فعالیت‌های میکروبی نیز برای درک مناسب از عملکرد اکوسیستم و اختلالات عملکردی خاک باید اندازه‌گیری شوند (۱۶). بنابراین، میزان فعالیت‌های متابولیسی ریزجانداران خاک را می‌توان با اندازه‌گیری CO_2 تولیدشده تعیین کرد. توانایی باکتری‌ها در تجزیه بستره‌های پیچیده با حضور فلزهای سنگین کاهش می‌یابد، بنابراین مقدار CO_2 تولید شده یک شاخص بسیار مطمئن از تأثیر آلودگی فلزهای سنگین بر فعالیت میکروبی است (۱۷). ضریب میکروبی که نسبت کربن میکروبی به کربن خاک می‌باشد نیز به عنوان یک شاخص قابل اعتماد برای ارزیابی آلودگی فلزهای سنگین

3- Soil basal respiration

4- Substrate induced respiration

1- Metabolic quotient

2- Microbial respiration quotient

مواد و روش‌ها

تهیه خاک و اندازه‌گیری برخی ویژگی‌های خاک: جهت اجرای آزمایش ابتدا خاک مورد نظر از عمق ۰-۲۰ سانتی‌متری از اراضی دانشگاه زنجان با مختصات جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۱ دقیقه طول شمالی و ۴۸ درجه و ۲۳ دقیقه عرض شرقی جمع‌آوری شد. پس از هوا خشک کردن و گذراندن خاک از الک دو میلی‌متری، ویژگی‌های مهم خاک با روش‌های استاندارد آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد (۲۰). این خاک دارای بافت لوم رسی شنی (به روش هیدرومتری)، pH (در گل اشباع) برابر با ۷/۷، EC (در عصاره گل اشباع) برابر با ۱/۱ دسی‌زیمنس بر متر، درصد کربنات کلسیم معادل برابر با ۱۶٪، درصد کربن آلی برابر ۰/۵۲٪ (به روش والکلی بلک)، مقدار فسفر قابل‌جذب (به روش اولسن) برابر با ۱۳/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و رطوبت گنجایش زراعی (FC) ۲۳/۴٪ بود.

طرح آزمایشی و اعمال تیمارها در خاک: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل سه سطح سرب (بدون آلودگی (Pb0)، ۲۵۰ (Pb250) و ۵۰۰ (Pb500) میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک) و سه سطح کاربرد کیتوسان (شاهد بدون کیتوسان (Ch0)، ۰/۶٪ (w/w) (Ch0.6) و ۱/۲٪ (w/w) (Ch1.2) بود. سطوح غلظت سرب با استفاده از نمک نیترات سرب در خاک ایجاد شد. مقدار نمک نیترات سرب مورد نیاز را در آب لازم برای رسیدن به حد رطوبت FC حل کرده و به خاک اسپری شد و هنگام اسپری به‌طور مرتب با بیلچه سترون به‌هم زده شد و برای رسیدن به حالت تعادل، دو ماه نگهداری شد. هم‌چنین با در نظر گرفتن بیش‌ترین تیمار سرب، غلظت‌های برابر از نیتروژن با استفاده از نیترات آمونیوم در همه تیمارها ایجاد شد. پودر کیتوسان

(تهیه شده از برند سیگما) برای تهیه دانه‌های کیتوسان استفاده شد. برای تهیه دانه‌های کیتوسان، پودر کیتوسان به مقدار ۲ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر محلول اسیداستیک ۰/۵٪ (V/V) حل شد و به مدت یک شب محلول گفته شده در دمای محیط قرار گرفت. محلول پس از یک شب به صورت لزوج و زرد رنگ درآمد. محلول کیتوسان درون بورت ریخته شد و با تنظیم خروجی بورت محلول به صورت قطره قطره وارد محلول هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار شد و در پی تغییر pH عمل لخته‌سازی انجام شد. درون ظرف هیدروکسید سدیم مگنت گنجانده شده بود و ظرف روی هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت، تا دانه‌های کیتوسان پس از خروج از بورت و رسوب در هیدروکسید سدیم به هم نچسبند و زودتر شکل بگیرند. دانه‌های جامد و سفید رنگ کیتوسان از محلول NaOH خارج و سپس با آب دیونیزه چندین بار شستشو داده شدند. پس از شستشو دانه‌ها در یک سینی پهن و در آن با دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شدند و سپس دانه‌های درشت با استفاده از الک ۵۰۰ میکرومتر حذف گردید. پس از خشک شدن دانه‌ها در ظرف دربسته و دور از نور خورشید و رطوبت نگهداری شدند (۶). سطوح مختلف کیتوسان با محاسبه وزن خاک در ظروف پلاستیکی دارای ۴۰۰ گرم خاک در سطح ۱/۲٪ و ۰/۶٪ وزنی اضافه و به‌طور یکنواخت با خاک مخلوط شد. ظروف به مدت ۴۵ روز در دمای ۲۲±۳ درجه سلسیوس و در تاریکی خوابانده شدند و در این مدت میزان رطوبت در حدود ۷۰٪ ظرفیت نگهداری آب در خاک حفظ شد.

اندازه‌گیری غلظت سرب قابل‌جذب: در پایان این دوره، فرآهمی زیستی سرب برای ۲ ساعت در دمای اتاق با محلول بافر (DTPA-TEA-CaCl₂, pH=7.3) بررسی شد. محتوای سرب با استفاده از دستگاه

انداختن CO₂ در محلول NaOH، که پس از آن با HCl تیترو می‌شود اندازه‌گیری شد. تنفس برانگیخته (SIR) با اضافه کردن گلوکز (w/w ۰/۰/۴) طبق تکنیک آیزرمیر همانند تنفس پایه به مدت ۶ ساعت اندازه‌گیری شد (۲۵). ضریب متابولیکی (qCO₂) نیز از نسبت BR به MBC محاسبه شد. ضریب تنفس میکروبی (QR) که نسبت بین تنفس پایه خاک به تنفس برانگیخته است نیز مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹).

شمارش جمعیت گروه‌های میکروبی در خاک: برای شمارش جمعیت گروه‌های میکروبی رقت‌های دهدهی از نمونه‌های خاک تهیه و پس از کشت در محیط‌های کشت مورد نظر شمارش به روش پلیت کانت^۴ انجام شد. سپس جمعیت (واحد تشکیل‌دهنده کلنی^۵ (cfu)) براساس تعداد کلنی، ضریب رقت و حجم نمونه کشت شده در گرم خاک محاسبه گردید (۲۵). برای کشت باکتری‌های هتروتروف از محیط کشت نوترینت آگار استفاده شد و سیکلوهگزامید به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها به محیط کشت افزوده شد. برای آماده‌سازی محیط کشت قارچ از محیط کشت PDA^۶ با اضافه کردن ۳۰ میلی‌گرم در لیتر استریتومایسین برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها استفاده شد. برای شمارش باکتری‌های سازنده اسپور، رقت‌های تهیه شده از نمونه‌های خاک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس گرما داده شدند و سپس بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت و پس از ۵ روز انکوباسیون شمارش شدند (۲۶). کشت و شمارش اکتینومیست‌ها در محیط گلیسرول-کازئین آگار به همراه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سیکلوهگزامید انجام شد (۲۷).

ICP-OES^۱ تعیین شد (۲۱). درصد زیست فرآهمی سرب اضافه شده از رابطه زیر به دست آمد:

$$BA (\%) = [(Qa - Qb) / Qc] \times 100 \quad (1)$$

که در آن، BA درصد زیست فرآهمی سرب، Qc مقدار سرب اضافه شده به خاک، Qa مقدار سرب استخراج شده از تیماری که به آن سرب اضافه شده است، Qb مقدار سرب استخراج شده از تیمار شاهد می‌باشد.

اندازه‌گیری کربن و نیتروژن زیتوده میکروبی: برای اندازه‌گیری کربن زیتوده میکروبی (MBC)^۲ و نیتروژن زیتوده میکروبی (MBN)^۳ از روش گازدهی-استخراج استفاده شد. پس از گازدهی با کلروفورم نمونه‌های خاک با استفاده از K₂SO₄ (۰/۵ مولار) عصاره‌گیری شد. کربن محلول در عصاره به روش اکسیداسیون با دی‌کرومات پتاسیم-تیتراسیون تعیین شد (۲۲). محاسبه MBC با استفاده از رابطه EC/K_{EC} اجرا شد که در آن EC اختلاف کربن استخراج شده از خاک گازدهی شده و گازدهی نشده است. K_{EC} که بخش قابل استحصال زیتوده میکروبی کربن پس از گازدهی است برابر با ۰/۳۸ برای انجام محاسبات در نظر گرفته شد (۲۳). MBN نیز با استفاده از رابطه EN/K_{EN} محاسبه شد که در آن EN اختلاف نیتروژن کل استخراج شده از خاک گازدهی شده و گازدهی نشده است که به روش کج‌لدال تعیین شد و K_{EN} برابر با ۰/۵۴ در نظر گرفته شد (۲۴).

اندازه‌گیری تنفس پایه و برانگیخته خاک: تنفس پایه خاک (BR) بر پایه CO₂ تولید شده در طی انکوباسیون خاک در یک سیستم بسته به مدت ۵ روز و به دام

4- Plate count method
5- Colony forming units
6- Potato Dextrose Agar

1- Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES)
2- Microbial biomass carbon
3- Microbial biomass nitrogen

و Cu) مورد بررسی قرار دادند. آنالیز FTIR¹ نشان داد که جذب فلزها بر همه پیوندهای شیمیایی مرتبط با اتم‌های N تأثیر می‌گذارد. از این رو منطقی است که اتم‌های N جای پیوند اصلی فلز روی کیتوسان باشند. هم‌چنین آنان گفتند که از بودن اتم‌های O در گروه‌های هیدروکسیل زنجیره نباید چشم‌پوشی شود زیرا نتایج بیانگر دخالت اتم‌های O در پیوند فلز در محلول خاک بود. با این حال، به نظر می‌رسد به دلیل جذب نیرومندتر جفت الکترون‌های تنها به هسته در اتم O نسبت به اتم N، اتم‌های O مطلوبیت کم‌تری برای جذب یون فلزی داشته باشند (۶). توران و همکاران (۲۰۱۸) کاهش معنی‌داری در غلظت نیکل، کادمیوم، کبالت، کروم و سرب در ریشه و بخش هوایی بادنجان در تیمارهای کیتوسان مشاهده کردند و کاربرد کیتوسان را تیماری کارآمد برای بی‌جنبش‌سازی فلزهای سنگین در خاک‌های آلوده دانسته‌اند (۲۸). هم‌چنین ظرفیت جذب بالای فلزهای سنگین سرب و مس از خاک توسط کیتوسان تهیه شده از قارچ گزارش شده است (۲۹). در پژوهشی نشان داده شد که کاربرد ۱/۱۵ گرم کیتوسان بر کیلوگرم خاک در سه خاک لومی، شنی و رسی به‌طور مصنوعی آلوده شده با کروم شش ظرفیتی و جیوه سبب کاهش معنی‌دار غلظت قابل‌جذب این فلزها پس از ۷ روز از شروع آزمایش گردید (۳۰).

کربن و نیتروژن زیتوده میکروبی و نسبت MBC:MBN: اثر سرب، کیتوسان و برهمکنش آن‌ها بر کربن و نیتروژن زیتوده میکروبی معنی‌دار بود. هم‌چنین اثر اصلی سرب و برهمکنش سرب و کیتوسان اثر معنی‌داری بر نسبت MBC: MBN نشان داد (جدول ۱).

آنالیز آماری: آنالیز داده‌های بیولوژیکی و غلظت سرب قابل جذب با استفاده از نرم‌افزار SPSS، مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰.۰۵٪ انجام گرفت. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

غلظت سرب قابل‌استخراج با DTPA و فرآهمی زیستی سرب: اثر سرب، کیتوسان و برهمکنش آن‌ها بر غلظت سرب قابل‌استخراج با DTPA و فرآهمی زیستی سرب معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاربرد کیتوسان در تیمار Pb250 سبب کاهش غلظت سرب قابل‌استخراج با DTPA گردید به‌طوری‌که با افزایش سطح کیتوسان این مقدار کاهش بیش‌تری نشان داد. در تیمار Pb500 کاربرد هر دو سطح کیتوسان Ch0.6% و Ch1.2% سبب کاهش غلظت سرب قابل‌استخراج گردید و بین سطوح به‌کار رفته تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P \leq 0.05$) (شکل ۱A). مقایسه میانگین نتایج درصد زیست فرآهمی سرب نشان‌دهنده آن است که افزایش میزان کاربرد کیتوسان در Pb250 سبب کاهش معنی‌دار درصد زیست فرآهمی گردید و کاربرد سطح ۱/۲٪ کیتوسان سبب کاهش زیست فرآهمی سرب به‌میزان ۴۲٪ در مقایسه با تیمار بدون کاربرد کیتوسان شد. ولی در تیمار Pb500 افزایش سطح کاربرد کیتوسان به‌طور معنی‌دار درصد زیست فرآهمی سرب را کاهش نداد و کاربرد سطح ۱/۲٪ کیتوسان منجر به کاهش زیست فرآهمی سرب به میزان ۱۲٪ در مقایسه با تیمار بدون کاربرد کیتوسان شد ($P \leq 0.05$) (شکل ۱B). کاماری و همکاران (۲۰۱۱) پتانسیل کیتوسان تهیه شده از زباله‌های شیلات را به عنوان یک اصلاح‌کننده خاک آلوده به فلزهای سنگین (Pb, Ag)

1- Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

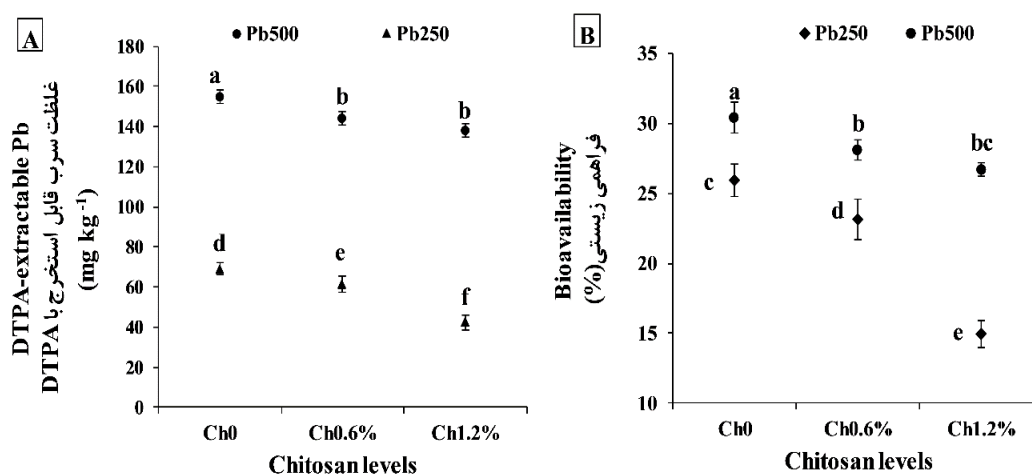
جدول ۱- تجزیه واریانس (مقادیر F محاسبه شده) اثر کاربرد سرب، کیتوسان و برهمکنش آن‌ها بر ویژگی‌های مطالعه شده در خاک.

Table 1. Analysis of variance (F values) on the effects of Pb, chitosan, and their interactions on the studied characteristics in soil.

												مقادیر F F values	
اکتیومیسیت‌ها Actinomycetes	باکتری های سازنده اسپور Spore forming bacteria	نسبت جمعیت قارچ به باکتری fungi/bacteria	ضریب تنفس میکروبی QR	ضریب متابولیسم qCO2	نسبت کربن به نیتروژن زیتوده میکروبی MBC/MBN	نیتروژن زیتوده میکروبی Microbial biomass N	کربن زیتوده میکروبی Microbial biomass C	تنفس برانگیخته Substrate induced respiration	تنفس پایه Basal respiration	فراهمی زیستی سرب Bioavailability of Pb	غلظت سرب قابل استخراج با DTPA DTPA-extractable Pb concentration		
9.24 ^{**}	6.55 ^{**}	3.63 [*]	22.84 ^{***}	0.44 ^{ns}	6.52 ^{**}	44.37 ^{***}	111.22 ^{***}	108.27 ^{***}	68.47 ^{***}	207.10 ^{***}	3568.11 ^{***}	Pb	
27.03 ^{***}	17.14 ^{***}	4.04 [*]	0.08 ^{ns}	7.16 ^{**}	0.48 ^{ns}	20.82 ^{***}	63.95 ^{***}	8.35 ^{***}	17.82 ^{***}	76.35 ^{***}	70.70 ^{***}	Chitosan	
0.81 ^{ns}	1.80 ^{ns}	2.30 ^{ns}	1.70 ^{ns}	3.16 [*]	4.90 ^{**}	8.30 ^{**}	7.06 ^{**}	1.30 ^{ns}	1.83 ^{ns}	23.90 ^{***}	7.74 ^{**}	Chitosan × Pb	

ns, *, **, *** به ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ می‌باشد

ns, *, **, *** indicate non-significant and significant at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels respectively



شکل ۱- غلظت سرب قابل استخراج با DTPA (A) و فراهمی زیستی سرب در خاک (B) در سطوح متفاوت کاربرد کیتوسان. Ch0، Ch0.6% و Ch1.2% به ترتیب نشان‌دهنده سطوح بدون کاربرد، ۰/۶٪ و ۱/۲٪ کیتوسان در خاک می‌باشد. Pb250 و Pb500 به ترتیب عبارتند از تیمار آلوده شده با ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) می‌باشند. حروف لاتین غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، $P \leq 0.05$).

Figure 1. DTPA-extractable Pb concentration (A) and bioavailability of Pb in soil (B) at different levels of chitosan application. Ch0, Ch0.6% and Ch1.2% represent 0, 0.6 and 1.2% chitosan (w/w), respectively. Pb250 and Pb500 represent contaminated soils with 250 and 500 mg Pb kg⁻¹ soil, respectively. The error bars represent the standard error (SE). Different letters indicate significant differences according to the Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

است. احتمالاً در تیمار Pb500 تعداد باکتری‌ها با شدت بیش‌تری کاهش یافته است و قارچ‌ها تحمل بیش‌تری نسبت به سمیت سرب از خود نشان داده‌اند و در نتیجه نسبت قارچ به باکتری در جامعه میکروبی تحت تنش سرب (Pb500) افزایش یافته است و باعث افزایش نسبت MBC:MBN (به دلیل نسبت MBC:MBN بیش‌تر در قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها) شده است. افزودن کیتوسان به خاک در تیمار Pb500 سبب کاهش معنی‌دار MBC:MBN گردید که احتمالاً به دلیل مساعد شدن شرایط برای رشد و فعالیت جامعه باکتری‌ها می‌باشد (۳۷).

تنفس پایه و برانگیخته: اثر سرب و کیتوسان بر تنفس پایه و برانگیخته معنی‌دار بود ولی برهمکنش آن‌ها اثر معنی‌داری بر این پارامترها نشان نداد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاربرد Pb500 در تمام سطوح کاربرد کیتوسان تنفس پایه (BR) را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. هم‌چنین در تمام سطوح کیتوسان تفاوت معنی‌داری از نظر BR بین دو تیمار Pb0 و Pb250 وجود نداشت. کاربرد کیتوسان ۱/۲٪ در سطوح Pb0 و Pb500 منجر به افزایش معنی‌دار BR در مقایسه با شاهد بدون کاربرد کیتوسان در سطح سرب مربوطه شد ولی در تیمار Pb250 کاربرد هر دو سطح کیتوسان BR را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد بدون کاربرد کیتوسان در این سطح سرب افزایش نداد (جدول ۲). به‌طورکلی با افزایش سطح سرب SIR کاهش یافت (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمار Pb500 در تمام سطوح کیتوسان منجر به کاهش معنی‌دار SIR نسبت به تیمار Pb0 و Pb250 شد. کاربرد کیتوسان در هیچ‌یک از سطوح سرب سبب افزایش معنی‌دار SIR نگردید (جدول ۲).

تیمار Pb500 به‌طور معنی‌داری MBC و MBN را کاهش داد. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد کاربرد هر دو سطح ۰/۶٪ و ۱/۲٪ کیتوسان در مقایسه با شرایط بدون کاربرد کیتوسان در خاک تحت تیمار Pb250 و Pb500 سبب افزایش معنی‌دار MBC گردید. با این حال در تیمار Pb0 فقط کاربرد سطح ۱/۲٪ کیتوسان سبب افزایش معنی‌دار MBC در مقایسه با تیمار بدون کاربرد کیتوسان شد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که فقط کاربرد کیتوسان در تیمار Pb500 منجر به افزایش معنی‌دار MBN نسبت به سطح بدون کاربرد کیتوسان گردید درحالی‌که در سایر سطوح سرب چنین اثری دیده نشد ($P \leq 0/05$) (جدول ۲).

همان‌طور که در شکل ۲A دیده می‌شود کاربرد تیمار Pb500 سبب افزایش معنی‌دار MBC: MBN در شرایط بدون کاربرد کیتوسان نسبت به سایر سطوح سرب گردید. هم‌چنین در سایر تیمارهای ترکیبی سرب و کیتوسان تفاوت معنی‌داری از نظر MBC: MBN دیده نشد (شکل ۲A). خان و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که مقدار MBC در نمونه‌های خاک ۲ و ۹ هفته پس از تیمار با فلز سنگین سرب به شدت کاهش یافت ولی پس از گذشت ۱۲ هفته، با وجود کاهش، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. هم‌چنین هنگامی‌که تیمار سرب به همراه کادمیوم در خاک اعمال شد کاهش MBC بسیار چشمگیر بود (۳۱). در منابع کاهش اندازه زیتوده میکروبی (۳۲)، یا عدم تغییر در MBC (۳۳)، کاهش جمعیت قابل کشت باکتری و قارچ (۳۴) یا کاهش اسیدهای چرب شاخص قارچی (۳۵) و نیز ساختار تغییر یافته جوامع قارچ و باکتری (۳۶) در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین در بلندمدت گزارش شده است. افزایش معنی‌دار MBC: MBN در شرایط بدون کاربرد کیتوسان در تیمار Pb500 احتمالاً نشان‌دهنده تغییر در ساختار جامعه میکروبی خاک

جدول ۲- اثر کاربرد کیتوسان و سرب در خاک بر تنفس پایه، تنفس برانگیخته و کربن و نیتروژن زیتوده میکروبی خاک.

Table 2. Effect of chitosan and Pb application on basal respiration, substrate induced respiration and microbial biomass C and N in soil.

سطوح سرب Pb levels	سطوح کیتوسان Chitosan levels	تنفس پایه Basal respiration (BR) ($\mu\text{gCO}_2\text{-C g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	تنفس برانگیخته Substrate induced respiration (SIR) ($\mu\text{gCO}_2\text{-C g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	کربن زیتوده میکروبی Microbial biomass C (mg kg^{-1})	نیتروژن زیتوده میکروبی Microbial biomass N (mg kg^{-1})
Pb0	Ch0	0.96 ± 0.11 ^{cd}	6.42 ± 0.82 ^{ab}	129.69 ± 3.17 ^c	14.76 ± 1.54 ^{bc}
	Ch0.6	1.13 ± 0.09 ^{abc}	6.38 ± 2.02 ^{ab}	160.62 ± 17.41 ^{bc}	18.88 ± 3.1 ^{ab}
	Ch1.2	1.31 ± 0.09 ^a	8.70 ± 1.98 ^a	179.93 ± 13.04 ^a	17.72 ± 2.43 ^{abc}
Pb250	Ch0	1.02 ± 0.14 ^{bc}	5.22 ± 1.69 ^b	132.54 ± 8.14 ^c	16.93 ± 3.14 ^{abc}
	Ch0.6	1.19 ± 0.11 ^{ab}	5.73 ± 1.22 ^b	166.33 ± 14.65 ^{ab}	16.64 ± 1.66 ^{abc}
	Ch1.2	1.17 ± 0.10 ^{ab}	7.52 ± 1.38 ^{ab}	159.22 ± 3.00 ^b	20.33 ± 3.22 ^a
Pb500	Ch0	0.44 ± 0.15 ^e	1.18 ± 0.22 ^c	48.75 ± 7.77 ^e	3.82 ± 0.63 ^e
	Ch0.6	0.58 ± 0.07 ^e	1.99 ± 0.24 ^c	100.73 ± 8.29 ^d	10.09 ± 2.71 ^d
	Ch1.2	0.85 ± 0.08 ^d	2.14 ± 0.31 ^c	134.13 ± 7.73 ^c	13.95 ± 1.81 ^{cd}

حروف لاتین غیرمشابه در هر ستون بیانگر تفاوت معنی دار می باشد (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، $P \leq 0.05$).

Ch0، Ch0.6% و Ch1.2% به ترتیب نشان‌دهنده سطوح بدون کاربرد، ۰/۶٪ و ۱/۲٪ (w/w) کیتوسان در خاک می‌باشد.

Pb0، Pb250 و Pb500 به ترتیب عبارتند از تیمار شاهد (بدون آلودگی) و آلوده شده با ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک.

Values labeled with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$) according to the Duncan's multiple range test.

Ch0، Ch0.6% and Ch1.2% represent 0، 0.6 and 1.2% chitosan (w/w), respectively.

Pb0، Pb250 and Pb500 represent control (non-contaminated) and contaminated soils with 250، and 500 mg Pb kg^{-1} soil, respectively.

هم‌چنین کاربرد تیمار کیتوسان منجر به تغییرات معنی‌دار در شاخص محاسبه شده در هیچ‌یک از سطوح سرب نگردید ($P \leq 0.05$) (شکل ۲C).

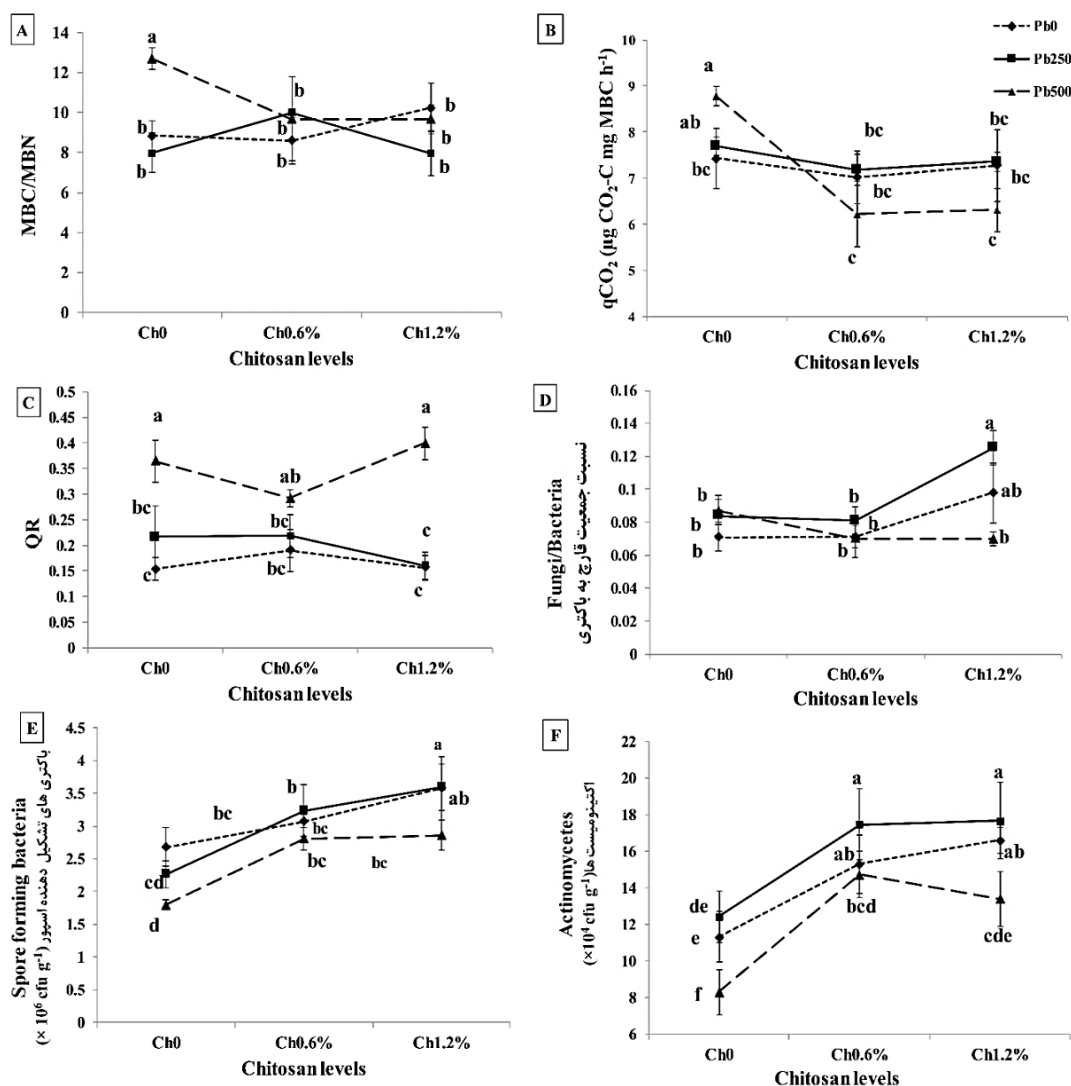
نتایج این پژوهش نشان‌دهنده آن است که تنفس پایه و برانگیخته در تیمار Pb250 تفاوت معنی‌داری با سطح شاهد سرب نداشت (جدول ۲). می‌توان گفت که ریزجانداران خاک ممکن است به سطوح پایین سرب مقاوم شده باشند و یا زیست‌فراهمی سرب برای ریزجانداران کاهش یافته باشد (شکل ۱B)، بنابراین تفاوت‌ها در این سطوح معنی‌دار نبود. افزایش تحمل در ریزجانداران پس از افزوده شدن سرب، احتمالاً در نتیجه توانایی رقابتی متفاوت ریزجانداران و مرگ گونه‌های حساس و سازگار شدن

شاخص‌های اکوفیزیولوژیک: همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود تنها اثر سرب بر ضریب تنفس میکروبی (QR) معنی‌دار بود ($P \leq 0.001$). با افزایش سطوح سرب QR روند افزایشی نشان داد (شکل ۲C). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمار Pb0 و Pb250 در همه سطوح کیتوسان از لحاظ QR وجود نداشت ($P \leq 0.05$) (شکل ۲C). کاربرد تیمار Pb500، QR را به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر سطوح سرب تحت شرایط بدون کاربرد کیتوسان افزایش داد. چنین اثری با کاربرد کیتوسان ۰/۶٪ دیده نشد ولی کاربرد سطح ۱/۲٪ کیتوسان اثر افزایشی معنی‌داری بر QR در تیمار Pb500 در مقایسه با سایر سطوح سرب نشان داد.

تفاوت معنی‌داری با Pb0 نشان نداد. تحت تیمار Pb0 و Pb250 کاربرد همه سطوح کیتوسان تفاوت معنی‌داری از نظر qCO_2 دیده نشد. با این حال نتایج نشان داد که با کاربرد کیتوسان در هر دو سطح ۰/۶٪ و ۱/۲٪ در تیمار Pb500، qCO_2 کاهش معنی‌داری داشت (شکل ۲B). همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود به‌طور کلی تنفس پایه و کربن زیتوده میکروبی بین تیمار Pb0 و Pb250 تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج ضریب متابولیک نیز که نشان‌دهنده نسبت تنفس پایه به MBC می‌باشد در تیمارهای Pb0 و Pb250 در همه سطوح کاربرد کیتوسان تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. عموماً مقدار شاخص ضریب متابولیک در خاک‌های آلوده شده با فلزهای سنگین بیش‌تر از خاک‌های غیرآلوده گزارش شده است (۱۶). به نظر می‌رسد که هرچه ضریب متابولیک کوچک‌تر باشد، چرخه‌های میکروبی کارآمدتر هستند (۳۹). به‌طور کلی پژوهش‌گران بیان نموده‌اند که خاک‌های آلوده به فلز سنگین، به گونه معنی‌داری ضریب متابولیک بالاتری دارند که نشان‌دهنده آن است که نیاز به انرژی بیش‌تر برای نگهداری ریزجانداران خاک است (۱۶). به‌عبارت دیگر ریزجانداران در شرایط تنش فلزهای سنگین ناگزیر به استفاده از بخش بزرگی از بودجه انرژی خود برای زنده‌مانی می‌شوند. نتایج نشان‌دهنده آن است که با افزودن کیتوسان به خاک در تیمار Pb500 ضریب متابولیکی کاهش معنی‌داری داشت (شکل ۲B) که می‌تواند نشان‌دهنده اثر مثبت آن بر اندازه زیتوده میکروبی و حفظ فعالیت تنفسی پایین‌تر و در نهایت استفاده بهتر از انرژی متابولیک باشد. پژوهش‌گران با افزودن کمپوست به خاک آلوده به علف کش روند مشابهی را گزارش کرده‌اند (۴۰).

باکتری‌های زنده مانده است (۳۸). تحت تیمار Pb500 تنفس پایه و برانگیخته به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد و تیمار Pb250 کاهش نشان داد (جدول ۲) که احتمالاً به دلیل تأثیر بیش‌تر آلودگی و کاهش ریزجانداران نسبت به دو تیمار دیگر سرب باشد. ضریب تنفس میکروبی حاصل تقسیم تنفس پایه به تنفس برانگیخته می‌باشد و به عنوان شاخصی برای ارزیابی بهم‌خوردگی در اکوسیستم خاک در نظر گرفته می‌شود.

پژوهش‌گران بیان نموده‌اند که تنفس پایه در خاک مربوط به میکروارگانسیم‌های کند رشد با استراتژی k می‌باشد در حالی که تنفس برانگیخته عموماً مربوط به میکروارگانسیم‌های فرصت‌طلب با استراتژی r می‌باشد (۱۲). در این پژوهش این شاخص اکوفیزیولوژیک در تیمار Pb500 به‌طور معنی‌داری در سطوح بدون کاربرد کیتوسان و ۱/۲٪ کیتوسان افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد و تیمار Pb250 نشان داد (شکل ۲C). این نتیجه نشان‌دهنده کاهش فعالیت ریزجانداران با استراتژی r در خاک آلوده است که ممکن است ناشی از تأثیر بیش‌تر سمیت فلز سنگین سرب بر فعالیت این دسته اکولوژیک از ریزجانداران خاکزی باشد. کاربرد کیتوسان در سایر سطوح فلز سنگین سرب اندکی از QR کاست ولی این کاهش معنی‌دار نبود که به‌طور کلی می‌تواند نشان‌دهنده شرایط بهتر جامعه زنده خاک تحت کاربرد کیتوسان باشد. اثر کاربرد کیتوسان و برهمکنش سرب و کیتوسان بر qCO_2 معنی‌دار بود (جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۲B دیده می‌شود تیمار Pb500 در شرایط بدون کاربرد کیتوسان موجب افزایش معنی‌دار qCO_2 گردید ولی این شناسه تحت تیمار Pb250



شکل ۲- اثر کاربرد کیتوسان بر نسبت کربن زیتوده میکروبی به نیتروژن زیتوده میکروبی (MBC/MBN) (A)، ضریب متابولیکی (qCO_2) (B)، ضریب تنفس میکروبی (QR) (C)، نسبت جمعیت قارچ به باکتری (fungi/bacteria) (D)، جمعیت باکتری‌های سازنده اسپور (E) و اکتینومیست‌ها (F) در خاک آلوده به سرب. Ch0، Ch0.6% و Ch1.2% به ترتیب نشان‌دهنده سطوح بدون کاربرد، ۰/۶ و ۱/۲ (w/w) کیتوسان در خاک می‌باشد. Pb0، Pb250 و Pb500 به ترتیب عبارتند از تیمار شاهد (بدون آلودگی) و آلوده شده با ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) می‌باشند. حروف لاتین غیرمشابه در هر نمودار بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (آزمون چند دامنه‌ای دانکن، $P \leq 0.05$).

Figure 2. Effect of chitosan application on MBC/MBN (A), qCO_2 (B), QR (C), fungi/bacteria ratio (D), number of spore forming bacteria (E) and actinomycetes (F) in soil contaminated with Pb. Ch0, Ch0.6% and Ch1.2% represent 0, 0.6 and 1.2% chitosan (w/w), respectively. Pb0, Pb250 and Pb500 represent non-contaminated and contaminated soils with 250, and 500 mg Pb kg^{-1} soil, respectively. The error bars represent the standard error (SE). Different letters indicate significant differences according to the Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

Pb0 و عدم کاربرد کیتوسان شد که نشان‌دهنده اثر مثبت و افزایشی این ترکیب تیماری بر جمعیت باکتری‌های سازنده اسپور است. با توجه به این‌که باکتری‌های سازنده اسپور از گروه گرم-مثبت‌ها هستند، می‌توان گفت که سازگاری فیزیولوژیک این گروه‌های باکتریایی و تولید اسپور مقاوم در برابر شرایط دشوار محیطی باعث می‌شود جمعیت این دسته از باکتری‌ها در طول تنش پایدار بماند (۴۱). در حالی‌که تیمار Pb250 اثر معنی‌داری بر جمعیت باکتری‌های تشکیل‌دهنده اسپور نداشت ولی تحت تیمار Pb500 که سمیت فلز بیش‌تر می‌باشد جمعیت این گروه از ریزجانداران نیز به‌طور منفی متأثر شده است. هم‌چنین به‌نظر می‌رسد ضمن سازگاری فیزیولوژیک گروه‌های باکتریایی سازنده اسپور در تیمار Pb250، شرایط رشد و تولیدمثل نیز برای این گروه میکروبی با کاربرد کیتوسان به ویژه در سطح ۱/۲٪ تقویت شده است. کاربرد کیتوسان در هر دو سطح ۱/۲٪ و ۰/۶٪ سبب افزایش معنی‌دار جمعیت اکتینومیست‌ها گردید و کاربرد تیمار Pb500 جمعیت اکتینومیست‌ها را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۲F). نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد تیمار Pb250 اثر معنی‌داری بر جمعیت اکتینومیست‌ها نداشت ولی تیمار Pb500 به‌طور معنی‌داری جمعیت این دسته از ریزجانداران را کاهش داد. به‌طور کلی نتایج پژوهش‌گران نشان می‌دهد که اکتینومیست‌ها می‌توانند به‌طور متفاوت به فلزهای سنگین پاسخ دهند. کونوپکا و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که در خاک‌های آلوده به سرب، ایزوله‌های متحمل به سرب همگی باکتری‌های گرم-مثبت و شامل گونه‌هایی از جنس *باسیلوس*^۱، *کورنیه‌فرم‌ها*^۲ و اکتینومیست‌ها بودند (۴۲). خان و همکاران (۲۰۱۰) حساسیت گروه‌های

جمعیت ریزجانداران: اثر اصلی سرب و کیتوسان بر نسبت جمعیت قارچ به باکتری، جمعیت باکتری‌های سازنده اسپور و اکتینومیست‌ها معنی‌دار بود ولی برهمکنش آن‌ها اثر معنی‌داری بر پارامترهای بررسی شده نشان نداد (جدول ۱). شکل ۲D نشان‌دهنده نسبت جمعیت قارچ به باکتری در تیمارهای مختلف سرب و کیتوسان است. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاربرد سطح ۱/۲٪ کیتوسان در خاک با تیمار Pb250 به‌طور معنی‌داری نسبت قارچ به باکتری بالاتری نسبت به سایر ترکیبات تیماری به همراه داشت ولی تفاوت معنی‌دار با کاربرد همین سطح از کیتوسان در تیمار Pb0 نشان نداد. در این پژوهش با کاربرد سرب نسبت جمعیت قارچ به باکتری نسبت به تیمار Pb0 افزایش نشان داد ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. شی و همکاران (۲۰۰۲) در ارزیابی ترکیب جمعیت میکروبی خاک و فعالیت آن‌ها در خاک‌های آلوده به سرب دریافتند که جمعیت قارچ‌ها در مکان‌های با غلظت زیاد این عناصر، بیش‌ترین فراوانی را داشتند و ترکیب جمعیت میکروبی خاک از باکتری‌ها (گرم-مثبت و گرم-منفی) به قارچ‌ها تغییر یافت (۴۱).

به‌طور کلی کاربرد کیتوسان جمعیت سازندگان اسپور در خاک را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. کاربرد Pb500 سبب کاهش معنی‌دار جمعیت باکتری‌های سازنده اسپور در شرایط بدون کاربرد کیتوسان نسبت به Pb0 گردید (شکل ۲E). کاربرد هر دو سطح کیتوسان در خاک با تیمار Pb250 و Pb500 منجر به افزایش معنی‌دار جمعیت باکتری‌های سازنده اسپور گردید ولی در خاک غیرآلوده افزایش معنی‌داری در جمعیت این ریزجانداران بر اثر کاربرد سطوح کیتوسان دیده نشد (شکل ۲E). هم‌چنین تیمار Pb250 به همراه کاربرد سطح ۱/۲٪ کیتوسان سبب افزایش جمعیت این گروه میکروبی نسبت به تیمار

1- *Bacillus*

2- *Coryneforms*

کیتیناز در خاک‌ها گسترده‌تر از کیتوساناز است (۴۷) ولی الگوی عمل کیتیناز برخی ریزجانداران بر روی کیتوسان گزارش شده است (۲۷). همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شده افزودن جاذب تجزیه‌پذیر، فعالیت زیستی را تقویت می‌کند که می‌تواند در خاک‌های آلوده که سمیت فلزهای سنگین ممکن است عملکردهای میکروبی طبیعی را مهار کند، مهم باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج بیانگر آن است که کاربرد تیمار Pb500 در خاک آثار سوئی بر جامعه زیستی خاک داشت و سبب تغییر در ساختار جامعه میکروبی خاک از جمله کاهش جمعیت اکتینومیست‌ها و باکتری‌های سازنده اسپور گردید. کاربرد این تیمار بسیاری از پارامترهای بررسی شده در این پژوهش از جمله جمعیت برخی گروه‌های میکروبی (جمعیت اکتینومیست‌ها و باکتری‌های سازنده اسپور) و شناسه‌های اکوفیزیولوژیک (ضریب متابولیک، ضریب تنفس میکروبی و نسبت MBC:MBN) را به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر قرار داد.

در حالی‌که با کاربرد تیمار Pb250 پارامترهای مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری با تیمار بدون آلودگی سرب نشان نداد. هم‌چنین، کاربرد کیتوسان ضمن کاهش درصد زیست‌فرآهمی سرب، اثر مثبت بر اندازه زیتوده میکروبی داشت. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که کیتوسان به عنوان یک جاذب زیست تجزیه‌پذیر علاوه بر کاهش غلظت سرب قابل جذب در خاک، فعالیت زیستی را تقویت می‌کند. این امر در خاک‌های آلوده که سمیت فلزها ممکن است عملکردهای میکروبی طبیعی را مهار کند، مهم می‌باشد و اهمیت کاربرد این نوع از جاذب‌ها را در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین نشان می‌دهد.

میکروبی نسبت به سمیت سرب و کادمیوم را به‌صورت باکتری‌ها < اکتینومیست‌ها > قارچ‌ها گزارش کرده‌اند (۳۱). برخی مطالعات نشان داده است که اکتینومیست‌ها نسبت به باکتری‌ها و قارچ‌ها مقاومت کم‌تری به فلزهای سنگین دارند. با این حال، در یک پژوهش دیگر، اکتینومیست‌ها نسبت به کادمیوم مقاوم‌تر از باکتری‌ها بودند (۴۳). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاربرد هر دو سطح ۰/۶٪ و ۱/۲٪ کیتوسان در خاک سبب افزایش معنی‌دار جمعیت اکتینومیست‌ها در تمام سطوح سرب (Pb0، Pb250 و Pb500) گردید ولی تفاوتی بین سطوح کاربرد کیتوسان دیده نشد ($P \leq 0.05$) (شکل ۲F). نتایج پژوهش‌گران نشان داده است که اکتینومیست‌ها به‌میزان قابل‌توجهی توان تجزیه کیتوسان را دارند (۴۴). چنین نتایجی ثابت می‌کند که کیتوسان به‌طور مؤثر توسط اکتینومیست‌ها به عنوان منبع کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۵). هم‌چنین با توجه به تأثیر کاربرد کیتوسان در افزایش تنفس پایه و MBC در سطح Pb0 می‌توان بخشی از اثرات ناشی از کاربرد کیتوسان به عنوان یک جاذب تجزیه‌پذیر بر جمعیت گروه‌های میکروبی و شناسه‌های اکوفیزیولوژیک را ناشی از تجزیه زیستی این پلیمر زیستی در خاک نیز دانست. کیتوسان در خاک می‌تواند توسط آنزیم‌های کیتوساناز (EC 3.2.1.132) تخریب شود. کیتوسان‌ها می‌توانند برای اهداف تغذیه‌ای توسط ریزجانداران در محیط دارای کیتوسان یا کیتین مورد استفاده قرار گیرند (۴۶). کیتوساناز به‌طور گسترده توسط ریزجانداران خاکزی تولید می‌شود. این آنزیم توسط گونه‌های باکتریایی و هم‌چنین توسط برخی قارچ‌ها ترشح می‌شود. باکتری‌های تجزیه‌کننده کیتوسان عموماً در میان باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کننده‌های کیتین قرار دارند (۴۷). اگرچه توزیع

منابع

- Sahoo, D., Sahoo, S., Mohanty, P., Sasmal, S., and Nayak, P. 2009. Chitosan: a new versatile bio-polymer for various applications. *Designed Monomers and Polymers*. 12: 5. 377-404.
- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendon, M., and Vottero, P. 2000. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*. 41: 7. 2463-2469.
- Gerente, C., Lee, V., Cloirec, P.L., and McKay, G. 2007. Application of chitosan for the removal of metals from wastewaters by adsorption-mechanisms and models review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 37: 1. 41-127.
- Hu, L., Yu, F., Wang, F., Yang, S., Peng, B., Chen, L., Wang, G., Hou, J., Dai, B., and Tian, Z. 2019. Overwhelming electrochemical oxygen reduction reaction of zinc-nitrogen-carbon from biomass resource chitosan via a facile carbon bath method. *Chinese Chemical Letters*. 31: 5. 1207-1212.
- Wu, F.C., Tseng, R.L., and Juang, R.S. 2010. A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as adsorbents for selected heavy metals. *Journal of Environmental Management*. 91: 4. 798-806.
- Kamari, A., Pulford, I., and Hargreaves, J. 2011. Chitosan as a potential amendment to remediate metal contaminated soil-a characterisation study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 82: 1. 71-80.
- Nwachukwu, O., and Pulford, I. 2011. Microbial respiration as an indication of metal toxicity in contaminated organic materials and soil. *Journal of Hazardous Materials*. 185: 2-3. 1140-1147.
- Kamari, A., Pulford, I., and Hargreaves, J. 2015. Biodegradation of chitosan and its effect on metal bioavailability. *Environmental Science and Pollution Research*. 22: 3. 1919-1930.
- De Boer, W., Gerards, S., Gunnewiek, P.K., and Modderman, R. 1999. Response of the chitinolytic microbial community to chitin amendments of dune soils. *Biology and Fertility of Soils*. 29: 2. 170-177.
- Zubair, M., Ramzani, P.M.A., Rasool, B., Khan, M.A., Akhtar, I., Turan, V., Tauqeer, H.M., Farhad, M., Khan, S.A., and Iqbal, J. 2021. Efficacy of chitosan-coated textile waste biochar applied to Cd-polluted soil for reducing Cd mobility in soil and its distribution in moringa (*Moringa oleifera* L.). *Journal of Environmental Management*. 284: 112047.
- Turan, V. 2019. Confident performance of chitosan and pistachio shell biochar on reducing Ni bioavailability in soil and plant plus improved the soil enzymatic activities, antioxidant defense system and nutritional quality of lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 183: 109594.
- Tripathy, S., Bhattacharyya, P., Mohapatra, R., Som, A., and Chowdhury, D. 2014. Influence of different fractions of heavy metals on microbial ecophysiological indicators and enzyme activities in century old municipal solid waste amended soil. *Ecological Engineering*. 70: 25-34.
- Kao, P.H., Huang, C.C., and Hseu, Z.Y. 2006. Response of microbial activities to heavy metals in a neutral loamy soil treated with biosolid. *Chemosphere*. 64: 1. 63-70.
- Mühlbachová, G. 2011. Soil microbial activities and heavy metal mobility in long-term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. *Ecological Engineering*. 37:7. 1064-1071.
- Vázquez, S., Carpena, R., and Bernal, M. 2008. Contribution of heavy metals and As-loaded lupin root mineralization to the availability of the pollutants in multi-contaminated soils. *Environmental Pollution*. 152: 2. 373-379.
- Brookes, P. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*. 19: 4. 269-279.
- Machulla, G., Zikeli, S., Kastler, M., and Jahn, R. 2004. Microbial biomass and respiration in soils derived from lignite ashes: a profile study. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 167: 4. 449-456.

18. Bhattacharyya, P., Tripathy, S., Chakrabarti, K., Chakraborty, A., and Banik, P. 2008. Fractionation and bioavailability of metals and their impacts on microbial properties in sewage irrigated soil. *Chemosphere*. 72: 4. 543-550.
19. Hund, K., and Schenk, B. 1994. The microbial respiration quotient as indicator for bioremediation processes. *Chemosphere*. 28: 3. 477-490.
20. Carter, M.R., and Gregorich, E.G. 2007. Soil sampling and methods of analysis. Chemical Rubber Company Press. Boca Raton, Florida. 1264p.
21. 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.
22. Nelson, D.W., and Sommers, L.E. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. P. 961-1010, In: J.M. Bigham (ed.), *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods*, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
23. 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.
24. Brookes, P., Landman, A., Pruden, G., and Jenkinson, D. 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 17: 6. 837-842.
25. Aliasgharzade, N. 2010. *Laboratory methods in soil biology*. Tabriz University Press. 522p. (Translated in Persian)
26. Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., Mcinerney, M.J., and Stetzenbach, L.D. 2002. *Manual of environmental microbiology*. American Society for Microbiology Press. Washington, DC. 1293p.
27. Pepper, I.L., Gerba, C.P., and Brendecke, J.W. 2005. *Environmental microbiology: a laboratory manual*. Academic Press, New York. 232p.
28. Turan, V., Khan, S.A., Iqbal, M., Ramzani, P.M.A., and Fatima, M. 2018. Promoting the productivity and quality of brinjal aligned with heavy metals immobilization in a wastewater irrigated heavy metal polluted soil with biochar and chitosan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 161: 409-419.
29. Alsharari, S.F., Tayel, A.A., and Moussa, S.H. 2018. Soil emendation with nano-fungal chitosan for heavy metals biosorption. *International Journal of Biological Macromolecules*. 118: 2265-2268.
30. Yan, H., and Lin, G. 2015. Usage of chitosan on the complexation of heavy metal contents and vertical distribution of Hg (II) and Cr (VI) in different textural artificially contaminated soils. *Environmental Earth Sciences*. 73: 5. 2483-2488.
31. 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.
32. Brandt, K.K., Frandsen, R.J., Holm, P.E., and Nybroe, O. 2010. Development of pollution-induced community tolerance is linked to structural and functional resilience of a soil bacterial community following a five-year field exposure to copper. *Soil Biology and Biochemistry*. 42: 5. 748-757.
33. Speir, T.W., Van Schaik, A.P., Hunter, L.C., Ryburn, J.L., and Percival, H.J. 2007. Attempts to derive EC50 values for heavy metals from land-applied Cu-, Ni-, and Zn-spiked sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 2. 539-549.
34. Oliveira, A., and Pampulha, M.E. 2006. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 102: 3. 157-161.
35. Bååth, E., Díaz-Raviña, M., Frostegård, Å., and Campbell, C.D. 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 1. 238-245.

36. Chao-Rong, G., and Zhang, Q.C. 2011. Microbial community structure and enzyme activities in a sequence of copper-polluted soils. *Pedosphere*. 21: 2. 164-169.
37. Kong, J., He, Z., Chen, L., Yang, R., and Du, J. 2021. Efficiency of biochar, nitrogen addition, and microbial agent amendments in remediation of soil properties and microbial community in Qilian Mountains mine soils. *Ecology and Evolution*. 11: 14. 9318-9331.
38. Molaei, A., Aliasgharzad, N., and Oustan, S. 2012. Effect of different Pb levels on bacterial and fungal populations during soil incubation. *Water and Soil Science*. 22: 3. 173-182. (In Persian)
39. Anderson, T.H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 98: 1. 285-293.
40. Perucci, P., Dumontet, S., Bufo, S., Mazzatura, A., and Casucci, C. 2000. Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*. 32: 1. 17-23.
41. Shi, W., Becker, J., Bischoff, M., Turco, R., and Konopka, A. 2002. Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 8. 3859-3866.
42. Konopka, A., Zakharova, T., Bischoff, M., Oliver, L., Nakatsu, C., and Turco, R. 1999. Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 5. 2256-2259.
43. Babich, H., and Stotzky, G. 1977. Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes, and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. *Applied Environmental Microbiology*. 33: 3. 681-695.
44. Brzezinska, M.S., Jankiewicz, U., and Walczak, M. 2013. Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 84: 104-110.
45. Hirano, S., Koishibara, Y., Kitaura, S., Taneko, T., Tsuchida, H., Murae, K., and Yamamoto, T. 1991. Chitin biodegradation in sand dunes. *Biochemical Systematics and Ecology*. 19: 5. 379-384.
46. Sawaguchi, A., Ono, S., Oomura, M., Inami, K., Kumeta, Y., Honda, K., Sameshima-Saito, R., Sakamoto, K., Ando, A., and Saito, A. 2015. Chitosan degradation and associated changes in bacterial community structures in two contrasting soils. *Soil Science and Plant Nutrition*. 61: 3. 471-480.
47. Struszczyk, M.H. 2002. Chitin and chitosan. Part II. Applications of chitosan. *Polimery*. 47: 396-403.
48. Mitsutomi, M., Ohtakara, A., Fukamizo, T., and Goto, S. 1990. Action pattern of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *Agricultural and Biological Chemistry*. 54: 4. 871-877.

