پیامد کاربرد پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر فراوانی و سوخت و ساز باکتری‌ها در خاک‌های آلوده و ناآلوده به فلزهای سنگین

زیبا نجف زاده نوبر[1] و علی‌اکبر صفری سنجانی

دانشجوی دکتری، گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا همدان؛ z_najafzadeh2002@yahoo.com

استاد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا همدان؛ aa-safari@basu.ac.ir

ص 193- 213

دریافت: 1400/12/23 و پذیرش: 1401/8/11

چکیده

هدف ازاین پژوهش بررسی پیامد سه پادزیست پرکاربرد آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر ویژگی‌های زیستی چون تنفس‌پایه و برانگیخته، و شمار همه باکتری‌ها درخاک‌های آلوده و ناآلوده به فلزهای سنگین است. آزمایش با طرح کامل تصادفی به گونه فاکتوریل با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای این پژوهش، خاک در سه گونه (خاک آلوده معدن، خاک چراگاه نزدیک معدن و خاک ناآلوده کشاورزی)، پادزیست در هفت تیمار (گواه بدون پادزیست، آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول هریک به‌اندازه 100و200میلی‌گرم درکیلوگرم خاک‌خشک) و زمان در سه بازه (گرماگذاری کوتاه مدت (صفر تا7 روز)، میان مدت (15و 30روز) و بلندمدت (60و90روز)) بودند. یافته‌های این‌پژوهش نشان داد که دربازه زمانی میان مدت، کاربرد 200میلی‌گرم در کیلوگرم ازپادزیست‌های آموکسی‌سیلین در خاک کشاورزی و مترونیدازول در خاک معدن، به دنبال هم بیش‌ترین (8/4958) و کم‌ترین (4/4594) لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک را نشان دادند. خاک چراگاه در گرماگذاری کوتاه مدت بیش‌ترین اندازه تنفس‌پایه (0/1066میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) و خاک کشاورزی در هر دو بازه زمانی بلندمدت (0/0144) و میان‌مدت (0/0172) کم‌ترین‌اندازه تنفس‌پایه را داشت. کاربرد 100میلی‌گرم مترونیدازول در کیلوگرم خاک چراگاه دربازه زمانی کوتاه‌مدت بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته خاک (0/0251 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت) و کاربرد 100میلی‌گرم آموکسی‌سیلین در کیلوگرم خاک کشاورزی دربازه زمانی میان‌مدت کم‌ترین تنفس برانگیخته خاک (0/0027) را نشان داد. به بیان دیگر می‌توان گفت خاک کشاورزی بیش‌ترین فراوانی باکتری‌ها و خاک معدن بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته را نشان داد. خاک چراگاه بیش‌ترین اندازه تنفس‌پایه را داشت و با خاک کشاورزی در فراوانی باکتری‌ها و خاک معدن در اندازه تنفس برانگیخته ناهمانندی معنی داری نداشت. خاک معدن کم‌ترین فراوانی باکتری‌ها و خاک کشاورزی کم‌ترین اندازه تنفس‌پایه و برانگیخته را نشان داد. کاربرد مترونیدازول بیش‌ترین اندازه تنفس‌پایه و برانگیخته، و کم‌ترین فراوانی باکتری‌ها را در پی‌داشت. کاربرد آموکسی‌سیلین و سفیکسیم به دنبال هم بیش‌ترین فراوانی باکتری‌ها و کم‌ترین اندازه تنفس برانگیخته رانشان داد. گرماگذاری دربازه‌زمانی کوتاه مدت بیش‌ترین اندازه‌های تنفس پایه و برانگیخته راداشت. بیش‌ترین فراوانی باکتری‌ها و کم‌ترین‌اندازه تنفس برانگیخته در زمان میان مدت دیده شد. بازه زمانی بلندمدت کم‌ترین فراوانی باکتری‌ها و کم‌ترین‌اندازه‌ی تنفس‌پایه را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پادزیست، تنفس‌پایه و برانگیخته، شمارباکتری‌ها

---

[1] نویسنده مسئول، آدرس: گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

مقدمه

ریزجانداران خاک بخش مهم بوم‌سازه هستند. ویژگی‌ها و فعالیت ریزجانداران خاک مانند تنفس خاک، معمولاً به عنوان شناسه‌های کیفیت خاک بهره‌گیری می‌شوند (یوت و همکاران، 2008). تنفس واقعی (تنفس پایه خاک) و پتانسیل تنفس ریزجانداران (تنفس برانگیخته با سوبسترا) روش‌های شناخته شده و گسترده‌ای برای اندازه‌گیری متابولیسم کربن توسط ریزجانداران خاک هستند (آنانیوا، 2008). بررسی توسط سیرا و همکاران (2012) نشان داده است که فرآیندهای تنفس حساس به آلودگی هستند. فعالیت تنفس خاک در غلظت بالای مس به شدت به خطر می‌افتد و محدود می‌شود (رومرو- فریر و همکاران، 2016). بررسی‌ها نشان داده‌اند که آلودگی درازمدت خاک با فلزهای سنگین نشانه‌های زیان‌آور بر فعالیت ریزجانداران خاک، به ویژه تنفس ریزجانداران دارد (دولمن و هاانسترا، 1984). برخی از فلزهای سنگین و متالوئیدها (به عنوان مثال، مس، روی، کبالت، آهن، منگنز و سلنیوم) به گونه گسترده در خوراک دام و طیور برای حفظ فرآیندهای فیزیولوژیکی گوناگون و جلوگیری از نارسایی سلامت دام بهره‌گیری می‌شوند.

از آن‌جایی که تمام این عناصر افزوده شده در جیره توسط دام ربایش نمی‌شوند، غلظت فزاینده‌ای از این عناصر در کوددامی دیده شده است (ساگر، 2007). بهره‌گیری از کود در زمین به گونه فزاینده‌ای به عنوان منبع اصلی ورود فلزهای سنگین به خاک شناخته می‌شود، که کاربردهای مکرر منجر به افزایش غلظت فلزهای سنگین در خاک شده است (زو و همکاران، 2013). توبر- کاپیون و همکاران (2005) نشان دادند که در شرایط تنش فلزهای سنگین، ریزجانداران پایدارتر تنفس خاک را افزایش می‌دهند زیرا کاربرد اکسیژن در طی فرآیند ضدعفونی افزایش می‌یابد، درحالی‌که ریزجانداران آسیب‌پذیر تنفس خاک را به دلیل مسمومیت کاهش مـی‌دهـند. اثر متقابل فلزهای سنگین و آلاینده‌های آلی نیز بر ریزجانداران زیستگاه به گونه گسترده گزارش شده است (دسوزا و همکاران، 2006).

بسیاری از بررسی‌ها نشان دادند که اثر متقابل پادزیست‌ها و فلزهای سنگین به گونه بالقوه برای باکتری‌ها و دیگر موجودهای زنده در زیستگاه خطرناک است. از زمان کشف پنی‌سیلین توسط الکساندر فلمینگ در سال 1928، پادزیست‌ها به سنگ بنای سیستم ایمنی ما دگرگون شده‌اند (کومرر، 2009). پادزیست‌ها یا به طور طبیعی یافت می‌شوند یا مواد شیمیایی ساخته شده به‌وسیله انسان هستند. منبع اصلی پادزیست‌ها در محیط، تخلیه فاضلاب، کود و آبزی پروری است (کومرر، 2009). بر اساس بررسی زانگ و همکاران (2015)، در سال 2013 برآورد شد که 54000 تن پادزیست به‌وسیله انسان و جانوران دفع شده و در کل 53800 تن از آن‌ها پس از تصفیه‌های گوناگون فاضلاب وارد زیستگاه شده است. به‌دلیل جذب ضعیف در دستگاه گوارش جانوران، درسد بالایی از داروهای دام‌پزشکی بیش‌تر به شکل ترکیب اصلی یا متابولیت‌های آن‌ها دفع می‌شوند (تیله برون، 2003). اندازه دفع داروها بین 10 تا 90 درسد دوز تجویز شده متفاوت است (هیرش و همکاران، 1999؛ مونتفورتس و همکاران، 1999؛ سوکول و همکاران، 2009).

با روش معمول ذخیره کودهای حیوانی در مزرعه، پادزیست‌های دام‌پزشکی در معرض فرآیندهای گوناگون تخریب مانند کانی شدن، جذب، هیدرولیز و تبدیل شیمیایی قرار می‌گیرند (لامشوف و همکاران، 2010). برای مثال بلک ول و همکاران (2005) نیمه عمر 79 روز را برای اکسی‌تتراسایکلین در کود خوک گزارش کردند. الکسی و همکاران (2004) آزمایشی برای ارزیابی تجزیه آموکسی‌سیلین، سفتریاکسون (سفیکسیم تزریقی) و مترونیدازول انجام دادند و مشخص شد که پس از 28 روز انکوباسیون، تنها 5 درصد از آموکسی‌سیلین و 1 درسد از مترونیدازول تجزیه می‌شود. بنابراین، نتیجه‌گیری

شد که این پادزیست‌ها به گونه مؤثری در تصفیه خانه‌های فاضلاب‌ها تجزیه نمی‌شوند. خاک‌ها مخزن برجسته‌ای برای پادزیست‌ها هستند، زیرا بیش‌تر پادزیست‌ها به شدت در خاک رایش می‌شوند و به راحتی تجزیه نمی‌شوند. پادزیست‌های مانده در خاک‌های کشاورزی معمولاً در اندازه‌های بالایی شناسایی می‌شوند که تا حد میکروگرم در کیلوگرم یا میلی‌گرم در کیلوگرم می‌رسند (ژو و همکاران، 2015). بررسی توسط لیو و همکاران (2009) نشان داد که سولفونامیدها و تری‌متوپریم مایه کاهش معنی دار کوتاه‌مدت در تنفس خاک کشاورزی می‌شوند. کنگ و همکاران (2006) گزارش کردند که پادزیست اکسی‌تتراسایکلین و فلز سنگین مس پیامد منفی معنی داری بر کارکرد اجتماع ریزجانداران خاک دارند، به ویژه هنگامی که هر دو آلاینده در زیستگاه ارائه می‌شوند. کنکل و وایت (2012) دریافتند سیپروفلوکساسین و سولفامتوکسازول توانایی کاهش تنفس خاک را دارند. با این وجود، هنگامی که پادزیست‌ها و فلزهای سنگین در خاک وجود دارند، مشخص نیست که کدام یک کارایی غالب را در پیدایش اختلال در فعالیت ریزجانداران دارد.

بنابراین، بررسی پیامد بالقوه پادزیست‌ها و فلزهای سنگین بر اختلال در کارکرد ریزجانداران خاک در غلظت‌های مرتبط با زیستگاه مهم است (تانگ و همکاران، 2020). روی‌هم‌رفته پادزیست‌ها، حتی آن‌هایی که به عنوان داروهای طیف گسترده طراحی شده‌اند، پیامدهای گزینشی خود را بر روی گروه‌های گوناگون ریزجاندارها دارند. درپی پیامدهای گزینشی پادزیست، فراوانی نسبی گونه‌های ریزجانداری دگرگون می‌شود و به‌دنبال آن در تعامل بین گونه‌های گوناگون تداخل ایجاد می‌شود (دینگ و هی، 2010). به گونه معنی داری، پیامد بر فراوانی ریزجاندارها به ویژگی‌های اصلی خاک (چرماک و همکاران، 2008)، گروه‌های ریزجاندارها (هامسفر و همکاران 2008)، و دوز پادزیست افزوده شده بستگی دارد (زیلزنی و همکاران 2006). در پژوهش هامسفر و همکاران (2008) درباره پیامد سولفادیازین، دگرگونی در سودوموناس‌ها و پروتئوباکتری‌ها کم‌تر از باکتری‌ها بود که احتمالاً به دلیل پایداری درون‌زاد سویه‌ها در این دو گروه است. هم ویژگی‌های شیمیایی درون‌زاد پادزیست‌ها و هم پارامترهای محیطی می‌توانند بر پیامد واقعی پادزیست‌ها بر جامعه ریزجانداری اثر بگذارند (دینگ و هی، 2010). از طرفی وجود فلزهای سنگین می‌تواند پایداری پادزیستی باکتری‌ها را القا کند و بر رشد آن‌ها در بوم‌سازه اثر بگذارد. (تای و همکاران، 2022). با این حال، تبادل ژن‌های پایدار به پادزیست بین ریزجاندارها از محیط در زمان‌های اخیر به روشنی ثبت شده است (سیلر و برندونک، 2012). قرار گرفتن در معرض فلزهای سنگین مایه پیدایش پایداری پادزیستی می‌شود. برای مثال، مس (Cu)، نیکل (Ni) و کادمیوم (Cd) پایداری آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین را القا می‌کنند (اوس و حسین، 2016). وجود نیکل (Ni)، کادمیوم (Cd)، کروم (Cr) و کبالت (Co) مایه تحریک پایداری باکتری‌ها به طیف گسترده‌ای از پادزیست‌ها مانند کانامایسین، آمپی‌سیلین و متی‌سیلین شد (سامانتا و همکاران، 2012).

بنابه پژوهش‌های انجام شده در دنیا کاربرد پادزیست‌ها می‌تواند پیامدهای چشم‌گیری بر ویژگی‌های گوناگون زیستی خاک داشته باشد که بزرگی این پیامدها در خاک‌های آلوده و ناآلوده به گونه هم‌زمان کم‌تر بررسی شده است. این پژوهش با بررسی پیامد بهره‌گیری از سه پادزیست پرکاربرد آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر برخی از ویژگی‌های زیستی خاک با هدف نشان دادن پیامد آلودگی خاک با فلزهای سنگین بر پایداری پادزیستی خاک انجام شد و برای رسیدن به آن از شناسه‌های تنفس‌پایه و برانگیخته، و فراوانی باکتری‌های خاک استفاده شد.

مواد و روش‌ها

جایگاه و چگونگی نمونه‌برداری خاک

برای انجام این پژوهش نیاز به دو گونه خاک آلوده و ناآلوده با فلزهای سنگین بود. خاک ناآلوده

کشاورزی با بافت لوم شنی از ژرفای 30-0 سانتی‌متری کشتزار پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان برداشت شد که در پنج سال گذشته کود دارای پادزیست دریافت نکرده بود، و خاک آلوده به فلزهای سنگین از معدن سرب و روی آهنگران در 23 کیلومتری شرق شهرستان ملایر در جنوب شرقی استان همدان با طول جغرافیایی "52'59°48 شرقی، عرض جغرافیایی "23'10°34 شمالی و بلندی 2029 متر و از چراگاه پیرامون معدن با طول جغرافیایی "10'00°49 شرقی، عرض جغرافیایی "30'09°34 شمالی و بلندی 2009 متر به گونه مرکب در سه تکرار نمونه‌برداری شد. هر یک از خاک‌ها جداگانه به خوبی آمیخته شد، بخشی از خاک‌ها هوا خشک و کوبیده شد و سپس از الک دو میلی‌متری گذرانده شد و برای بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن نگهداری شد و بخشی دیگر از خاک کوبیده و از الک دو میلی‌متری گذرانده شد و برای بررسی ویژگی‌های زیستی آن به ریخت تازه و با همان نم خود نگهداری شد.

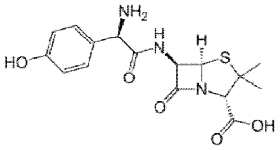
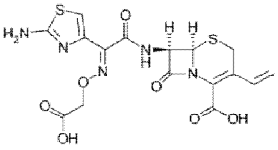
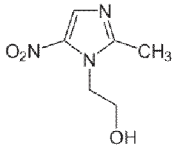
بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها

سنجش بافت خاک بر پایه قانون استوکس و به روش هیدرومتری انجام شد (گی و بادر، 1986). رسانایی الکتریکی در عصاره 1:2 خاک به آب، به کمک دستگاه هدایت سنج جن‌وی 4510 در دمای بیست و پنج درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (رودز، 1996). پ-اچ خاک در عصاره 1:2 خاک به آب به کمک دستگاه پ-اچ متر ایستک 25ان اندازه‌گیری شد (توماس و همکاران، 1996). کربنات کلسیم معادل خاک به روش تیتراسیون برگشتی با هیدروکسید سدیم اندازه‌گیری شد (لوییپرت و اسکوراز، 1996). گنجایش تبادل کاتیونی خاک به روش استات آمونیوم یک نرمال اندازه‌گیری شد (باور و همکاران، 1952). اندازه‌گیری کربن‌آلی خاک به روش اکسایش‌تر انجام گرفت (واکلی و بلاک، 1934). پتاسیم فراهم به روش استات آمونیوم و با دستگاه فلیم فتومتر جن‌وی پی‌اف‌پی7 اندازه‌گیری شد (کلوت، 1986). فسفر فراهم (در عصاره بی‌کربنات سدیم با پ-اچ هشت و نیم) به روش مورفی و ریلی (1962) و با دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش-مرئی کری100 اندازه‌گیری شد. و غلظت همه فلزهای سنگین در خاک به روش هضم با اسیدنیتریک با دستگاه جذب اتمی واریان 220اف‌اس اندازه‌گیری شد (هلریچ، 1990).

فراهم و آماده‌سازی پادزیست‌ها

سه پادزیست پرکاربرد آموکسی‌سیلین (بتالاکتام)، سفیکسیم (سفالوسپورین) و مترونیدازول (نیتروایمیدازول) که ویژگی‌های آن‌ها در جدول1 آمده است از داروخانه همدان خریداری شد. کپسول آموکسی‌سیلین (500 میلی‌گرم) و قرص سفیکسیم (400 میلی‌گرم) هر دو ساخت شرکت داروسازی دانا تبریز-ایران و قرص مترونیدازول (500 میلی‌گرم) ساخت پارس دارو تهران-ایران بودند. در آغاز قرص و محتوی درون کپسول (آموکسی‌سیلین بدون رویه‌ی کپسول آن بهره‌گیری شد) برای هر سه پادزیست به دقت وزن شدند، وزن هم‌سنگ ماده ناب پادزیست به‌دست آمد. سپس در هاون کوبیده و همگن شدند و پس از آن وزن مورد نیاز برای آماده‌سازی محلول‌هایی برای غلظت‌های 100 و 200 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک خشک به‌کار رفتند. برای جلوگیری از دگرگونی ناخواسته در کیفیت داروها، محلول آن‌ها در همان روز آزمایش ساخته شد. هم‌چنین همه مواد شیمیایی بهره‌گیری شده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان فراهم شد.

جدول 1- برخی ویژگی‌های پادزیست‌های بکار رفته در پژوهش

	آموکسی‌سیلین Amoxicillin	سفیکسیم Cefixime	مترونیدازول Metronidazole
فرمول	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	$C_{16}H_{15}N_5O_7S_2$	$C_6H_9N_3O_3$
ساختار شیمیایی			
دسته‌بندی پادزیستی	بتالاکتام‌ها خانواده پنی‌سیلین	سفالوسپورین‌ها نسل سوم	نیتروایمیدازول‌ها
باکتری‌های گروه هدف	بسیاری از باکتری‌های G^+ و G^-	باکتری‌های G^-	باکتری‌های بی‌هوازی
مکانیسم پیامد	جلوگیری از ساخت پپتیدوگلیکان دیواره یاخته و تخریب دیواره یاخته باکتری	مانند بتالاکتام‌ها پیامد بر دیواره یاخته باکتری	احیاء شدن پس از جذب در درون یاخته و دگرگون شدن به متابولیت سمی و آسیب رساندن به DNA یاخته
شماره CAS	26787-78-0	79350-37-1	443-48-1
وزن مولکولی (گرم در مول)	365/40	453/44	171/156
اندازه‌های pK_a	pKa_1=2.74 pKa_2=7.4 pKa_3=9.01 pKa_4=10.29 پاسامونتس و کالائو (2006)	pKa_1=2.10 pKa_2=2.92 pKa_3=3.45 سیگراوغلو و همکاران (2021)	pKa_1=2.58 pKa_2=14.48 سپهر و همکاران (2017)

آماده‌سازی تیمارها

محلول‌های آبی سه پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول با آب مقطر آماده شد و به گونه جداگانه برای هر زمان گرماگذاری به وزن معادل خاک خشک افزوده شد و به خوبی به‌هم زده شد. سپس آب مقطر سترون به نمونه‌های خاک افزوده شد تا به نزدیک رطوبت گنجایش زراعی برسد. برای هر تیمار از پادزیست‌ها 100 و 200 میلی‌گرم پادزیست در کیلوگرم خاک خشک، به همراه تیمار گواه (بدون پادزیست) در سه تکرار آزمایش شد (سرهم 63 نمونه). نمونه‌های خاک تیمار شده در تاریکی و در دمای آزمایشگاه (نزدیک 25 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

زمان گرماگذاری

تنفس پایه و برانگیخته در هشت زمان: صفر (بدون گرماگذاری)، 1، 3، 7، 15، 30، 60 و 90 روز پس از گـرماگذاری اندازه‌گیری شد. برای امکان انجام آزمایش چهار زمان آغازین به گونه جداگانه گرماگذاری شدند و از زمان پانزده روز تا پایان نود روز یک‌جا گرماگذاری شدند که در زمان‌های یاد شده از خاک انکوبه شده نمونه‌برداری شد و تنفس پایه و برانگیخته آن‌ها با روش‌های ویژه خود اندازه‌گیری شد. در زمان 90 روز گرماگذاری هر 10 روز یک‌بار نم خاک به روش وزنی کنترل و در نزدیک گنجایش زراعی با افزودن آب مقطر سترون نگهداری شد (پس از هر بار نمونه‌برداری نیز وزن کم شده در این محاسبه به دقت به کار رفت). هم‌زمان با افزودن آب مقطر سترون نمونه‌های خاک به خوبی هم‌زده می‌شدند تا زیستگاه هوازی در همه جای خاک فراهم گردد.

اندازه‌گیری تنفس پایه و برانگیخته

تنفس پایه خاک برآوردی از تندی کانی شدن ماده‌آلی خاک می‌باشد که با کمی دگرش به روش

مارابوتینی و همکاران (2013) بر پایه میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن پدید آمده از یک گرم خاک در یک روز اندازه‌گیری شد. همچنین تنفس برانگیخته به روش امینیان و همکاران (2018) با اندازه‌گیری میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن پدید آمده در یک ساعت از یک گرم وزن خشک خاک در درون ظرف دربسته پلاستیکی اندازه‌گیری و برآورد شد. ظرف پلاستیکی پیش از آغاز آزمایش برای آب‌بندی کامل آن کنترل شد. برای اندازه‌گیری تنفس پایه ($mg\ CO_2\ g^{-1}\ dry\ soil\ .day^{-1}$)، 25 گرم از نمونه‌های خاک با آب مقطر سترون تا نزدیک گنجایش زراعی مرطوب شده و درون ظرف‌های پلاستیکی گفته شده در بالا به همراه ظرف شایسته دارای 25 میلی لیتر سود 0/25 نرمال گذاشته شد و برای 7 روز در دمای آزمایشگاه در تاریکی گرماگذاری شدند. دی‌اکسیدکربن پدید آمده سود را خنثی کرده و اندازه سود مانده در روز هفتم با اسیدکلریدریک 0/25 نرمال تیتر شد. هم‌چنین سه نمونه گواه به همان روش بالا و در ظرف پلاستیکی بدون خاک آماده و آزمون شد. ناهمانندی میان سود مانده در ظرف گواه و نمونه نشانگر دی‌اکسیدکربن پدید آمده از نمونه خاک می‌باشد. برای اندازه‌گیری تنفس برانگیخته ($mg\ CO_2\ .g^{-1}\ dry\ soil\ .h^{-1}$)، آمیخته‌ای از 0/5 گرم گلوکز، 0/01 گرم دی پتاسیم فسفات و 0/07 گرم کلریدآمونیوم به 25 گرم خاک افزوده شد و به خوبی هم زده شد. آن‌گاه با آب مقطر سترون به نم نزدیک گنجایش زراعی رسانده شد، و پس از 16 ساعت نگهداری در تاریکی و دمای آزمایشگاه سود درون ظرف تیتر شد.

شمار همه باکتری‌های خاک

برای آماده‌سازی سوسپانسیون از خاک‌ها، یک گرم از خاک را در لوله آزمایش دارای 9 میلی‌لیتر آب‌مقطر سترون ریخته و لوله آزمایش تکان داده شد و سری‌های رقت تا رقت‌های موردنیاز آماده شد. از هر رقت به اندازه 100 میکرولیتر به کمک سرسمپلر سترون برداشته و بر محیط کشت با کمک پی‌پت پاستور آماده شده سترون در کنار شعله پخش شد. از هر تیمار سه تکرار در سه پتری مایه‌زنی شد. سپس پتری دیش‌ها به گونه وارونه در گرم‌خانه در دمای 28/2 درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. در این بررسی بهترین رقت‌ها برای شمارش ریزجاندارها در خاک با تکرار در هر 8 مرحله زمانی به دست آمد.

فراوانی باکتری‌ها به روش کلنی‌شماری در کشتگاه پایه نوترینت آگار (N.A) که در بردارنده همه نیازهای غذایی رشد برای بیش‌تر باکتری‌ها است، شمارش شد. این کشتگاه جامد و دارای عصاره گوشت، ماده پروتئینی پپتون، ژلاتین گوارشی و آگار می‌باشد (صفری سنجانی و همکاران، 1389؛ آلف و نانی پیری، 1995).

تجزیه و تحلیل آماری

همان‌گونه که یادآور شد این پژوهش به ریخت فاکتوریل با سه فاکتور: خاک در سه گونه (خاک ناآلوده کشاورزی، خاک آلوده معدن و خاک چراگاه نزدیک معدن)، پادزیست در هفت تیمار (گواه یا بدون پادزیست، آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، و مترونیدازول هر یک به اندازه 100 و 200 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک خشک) و زمان در سه بازه (کوتاه‌مدت، میان‌مدت و بلندمدت) با طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. گرماگذاری در هشت مرحله زمانی (صفر، 1، 3، 7، 15، 30، 60 و 90 روز) انجام گرفت و سپس میانگین دیتاهای سه بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز)، میان‌مدت (15 و 30 روز) و بلندمدت (60 و 90 روز) در زمان گرماگذاری 90 روزه پردازش و آنالیز شد. برای پردازش داده‌های هر آزمایش و رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL 2010 و برای آزمون آماری از نرم افزار SPSS 20 بهره‌گیری شده است. نرمال بودن دیتاها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. پیامد کاربرد هر یک از تیمارها و اثر متقابل آن‌ها با انجام تجزیه واریانس ارزیابی شد. آزمون میانگین هر یک از ویژگی‌های یاد شده در تیمارهای به‌کار رفته به دلیل شمار زیاد میانگین‌ها با روش توکی در پایه پنج درسد انجام شد. در جدول‌ها میانگین دیتاها ± انحراف معیار آورده شده است.

نتایج

برخی از ویژگی‌های خاک‌های نمونه‌برداری شده

نتایج آزمایش برخی از ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک‌هایی که برای این پژوهش بهره‌گیری شد در جدول2 آمده است. همان‌گونه که دیده می‌شود خاک کشاورزی دارای بالاترین درسد رس و کربن آلی، و اندازه pH، گنجایش تبادل کاتیونی، پتاسیم فراهم و درسد رس و سیلت و کربنات کلسیم معادل است. در خاک معدن نیز اندازه رسانایی الکتریکی و درسد شن به گونه معنی داری بیش‌تر از دو خاک دیگر است.

فسفر فراهم می‌باشد. خاک چراگاه دارای بیش‌ترین اندازه

جدول 2- آزمون میانگین ویژگی‌های خاک‌های بهره‌گیری شده در پژوهش

	خاک کشاورزی	خاک چراگاه	خاک معدن
pH (عصاره 1:2)	6/74 ± 0/05 c	7/39 ± 0/02 a	7/16 ± 0/03 b
رسانایی الکتریکی(عصاره 1:2) (dS/m)	0/44 ± 0/00 b	0/38 ± 0/01 c	0/50 ± 0/01 a
گنجایش تبادل کاتیونی($cmol^+/kg$)	19/75 ± 0/00 b	23/21 ± 0/26 a	4/12 ± 0/48 c
شن (%)	58/96 ± 1/07 b	41/41 ± 0/93 c	65/90 ± 0/53 a
سیلت (%)	26/73 ± 1/94 c	43/23 ± 0/93 a	31/01 ± 0/53 b
رس (%)	14/30 ± 1/42 a	15/35 ± 0/00 a	3/07 ± 0/53 b
کربنات کلسیم معادل (%)	1/43 ± 0/38 c	25/21 ± 0/53 a	11/35 ± 0/63 b
کربن آلی (%)	0/90 ± 0/04 a	0/73 ± 0/03 b	0/32 ± 0/03 c
ماده آلی (%)	1/56 ± 0/07 a	1/26 ± 0/06 b	0/56 ± 0/06 c
پتاسیم فراهم (mg/kg)	161/20 ± 2/34 b	243/03 ± 4/09 a	3/96 ± 2/31 c
سدیم فراهم (mg/kg)	161/75 ± 8/67 ns	184/20 ± 4/62 ns	164/74 ± 18/13 ns
فسفر فراهم (mg/kg)	21/66 ± 0/79 a	13/37 ± 0/31 b	6/94 ± 0/48 c
بافت	لوم شنی	لومی	لوم شنی

میانگین‌های دارای حرف های یکسان در هر ردیف ناهمانندی معنی داری در پایه آماری پنج درسد ندارند و ns بدون ناهمانندی معنی دار است.

اندازه برخی از فلزهای سنگین در خاک‌های آزمایش شده

غلظت فلزهای سنگین در خاک‌های نمونه‌برداری شده در جدول3 فهرست شده است. اندازه-های گزارش شده میانگین سه تکرار است. غلظت فلزهای سنگین در خاک‌های آزمایش شده به گونه زیر است: آهن 18775/00-84140/00 میلی‌گرم در کیلوگرم، سرب 31/00-10157/88 میلی‌گرم در کیلوگرم، روی 52/50-4432/50 میلی‌گرم در کیلوگرم، کادمیوم 39/16-0/75 میلی‌گرم در کیلوگرم، مس 15/50-92/50 میلی‌گرم در کیلوگرم، منگنز 375/00-11635/00 میلی‌گرم در

کیلوگرم و منیزیم 2177/25-11625/00 میلی‌گرم در کیلوگرم. گذشته از منیزیم، بیش‌ترین اندازه فلزها در خاک نمونه‌برداری شده از معدن (آهنگران) دیده شد. ترتیب آلودگی خاک‌ها به گونه خاک معدن> خاک چراگاه> خاک کشاورزی بود. به هرگونه اندازه فلزهای سنگین در خاک چراگاه نمونه‌برداری شده که در نزدیکی این معدن بود نیز بسیار بالا بود و بیش‌ترین غلظت منیزیم در خاک چراگاه اندازه گرفته شد. اندازه‌های بالای فلزهای سنگین در خاک چراگاه می‌تواند وابسته به ساختار مواد مادری خاک باشد که در نزدیکی معدن است.

جدول 3- آزمون میانگین اندازه برخی فلزهای سنگین خاک‌های بهره‌گیری شده در پژوهش

فلزهای سنگین	خاک کشاورزی	خاک چراگاه	خاک معدن
آهن	22691/67 ± 965/03 b	20708/33 ± 1678/97 b	73110/00 ± 14143/22 a
سرب	33/20 ± 1/96 b	67/79 ± 1/90 b	9749/66 ± 361/45 a
روی	58/33 ± 7/10 b	89/16 ± 2/60 b	3839/20 ± 514/42 a
کادمیوم	0/75 ± 0/00 b	1/54 ± 0/07 b	37/53 ± 1/63 a
مس	16/45 ± 0/19 b	18/70 ± 3/69 b	89/58 ± 4/01 a
منگنز	387/50 ± 12/50 b	837/50 ± 90/13 b	9816/66 ± 1916/58 a
منیزیم	6052/08± 283/55 b	11166/67 ± 772/30 a	4697/32 ± 2198/67 b

میانگین‌های دارای حرف های یکسان در هر ردیف ناهمانندی معنی داری در پایه آماری پنج درسد ندارند.

تنفس پایه

یافته‌های تجزیه واریانس پیامد گونه خاک، پادزیست و زمان بر تنفس پایه در زمان گرماگذاری 90 روزه نشان داد که اثر اصلی تیمارها و اثر متقابل گونه خاک و زمان بر این فراسنجه خاک از دیدگاه آماری معنی دار بود ($p<0.01$) ولی اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه تیمارها از دیدگاه آماری معنی دار نبود. آزمون میانگین تنفس پایه نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین اندازه تنفس پایه به ترتیب وابسته به خاک چراگاه و خاک کشاورزی (0/0709 و 0/0200 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) می‌باشد (جدول 4). از سوی دیگر در بررسی اثر اصلی پادزیست دیده شد که در همه تیمارهای کاربرد پادزیست اندازه تنفس پایه در برابر گواه افزایش معنی داری داشت، بجز تیمارهای کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین و سفیکسیم که ناهمانندی معنی داری با گواه نداشتند. کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول بیش‌ترین اندازه تنفس پایه (0/0532 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) را در برابر گواه (0/0430 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) نشان داد. در اثر اصلی زمان گرماگذاری، اندازه تنفس پایه با گذشت زمان کاهش یافت که بیش‌ترین و کم‌ترین اندازه تنفس پایه به ترتیب وابسته به بازه زمانی کوتاه‌مدت و بلندمدت (0/0649 و 0/0298 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) می‌باشد (جدول 4).

یافته‌های آزمون میانگین تنفس پایه در زمان گرماگذاری 90 روزه در اثر متقابل گونه خاک و زمان (جدول 4) نشان داد که بیش‌ترین اندازه تنفس پایه در خاک چراگاه در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) به اندازه 0/1066 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز و کم‌ترین اندازه آن در خاک کشاورزی در بازه‌های زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) و میان‌مدت (15 و 30 روز) به ترتیب با اندازه‌های 0/0144 و 0/0172 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز دیده شد. در خاک کشاورزی اندازه تنفس پایه با گذشت زمان کاهش یافت و تقریبا ثابت شد، در خاک معدن اندازه تنفس پایه در آغاز افزایش و سپس کاهش یافت. ولی در خاک چراگاه اندازه تنفس پایه با گذشت زمان کاهش یافت. در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) ترتیب اندازه تنفس پایه به شکل خاک چراگاه>خاک معدن>خاک کشاورزی بود. در بازه زمانی میان‌مدت (15 و 30 روز) ترتیب اندازه تنفس پایه به شکل خاک چراگاه≈خاک معدن>خاک کشاورزی بود. در بازه زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) ترتیب اندازه تنفس پایه به شکل خاک معدن≈خاک چراگاه>خاک کشاورزی بود.

جدول 4- آزمون میانگین تنفس‌پایه (میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در روز) ریزجانداران خاک در اثر متقابل دوگانه و نیز اثر اصلی زمان گرماگذاری و گونه خاک

زمان گرماگذاری	اثر متقابل دوگانه زمان گرماگذاری و گونه خاک			اثر اصلی زمان گرماگذاری
	خاک کشاورزی	خاک معدن	خاک چراگاه	
کوتاه‌مدت (صفر تا 7روز)	0/028± 0/006 e	0/059± 0/004 c	0/106± 0/007 a	0/064± 0/033 A
میان‌مدت (15 و30روز)	0/017± 0/010 f	0/068± 0/013 b	0/071± 0/008 b	0/052± 0/027 B
بلندمدت (60 و90روز)	0/014± 0/010 f	0/040± 0/005 d	0/034± 0/007 de	0/029± 0/013 C
اثر اصلی گونه خاک	0/020± 0/011 C	0/056± 0/014 B	0/070± 0/030 A	

میانگین‌های دارای حرف های یکسان در اثر متقابل دوگانه ناهمانندی معنی داری در پایه آماری پنج درسد ندارند.

تنفس برانگیخته با سوبسترا

یافته‌های تجزیه واریانس پیامد گونه خاک، پادزیست و زمان بر تنفس برانگیخته در گرماگذاری 90 روزه نشان داد که اثر اصلی تیمارها و اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه آن‌ها بر این فراسنجه خاک از دیدگاه آماری معنی دار بود ($p<0.01$)، بنابراین پاسخ‌دهی تنفس برانگیخته به تیمارهای بررسی شده بیش‌تر از تنفس پایه بود.

یافته‌های آزمون میانگین تنفس برانگیخته در زمان گرماگذاری 90 روزه در اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست (جدول 5) نشان داد که بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته در تیمارهای بدون کاربرد پادزیست در خاک چراگاه، کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین در خاک معدن و کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول در خاک کشاورزی به دنبال هم به اندازه‌های 0/0171، 0/0156 و 0/0155 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت بود. کم‌ترین اندازه تنفس برانگیخته در تیمار کاربرد 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم سفیکسیم در خاک کشاورزی به اندازه 0/0083 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن بر گرم خاک خشک در ساعت دیده شد. در خاک چراگاه کاربرد همه تیمارهای پادزیست پیامد کاهشی بر اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه داشتند ولی این کاهش‌ها معنی دار نبودند، و بیش‌ترین کاهش با کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین دیده شد. در خاک معدن کاربرد همه تیمارهای پادزیست پیامد کاهشی بر اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه داشتند ولی این کاهش‌ها معنی دار نبودند، بجز تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین که مایه بهبود اندازه تنفس برانگیخته شد و ناهمانندی معنی‌داری با گواه نداشت. در خاک کشاورزی تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول اندازه تنفس برانگیخته را در برابر گواه افزایش معنی دار داد (62/21 درسد) ولی کاربرد دیگر تیمارها ناهمانندی معنی داری با گواه نداشتند.

در خاک کشاورزی اندازه تنفس برانگیخته با گذشت زمان در آغاز کاهش و سپس افزایش یافت، در خاک معدن نیز روند همانندی دیده شد ولی این دگرش‌ها در اندازه تنفس برانگیخته معنی دار نبود (جدول 5). در خاک چراگاه اندازه تفس برانگیخته با گذشت زمان کاهش معنی داری یافت. در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) ترتیب اندازه تنفس برانگیخته به شکل خاک چراگاه>خاک معدن>خاک کشاورزی بود. باید در نظر گرفته شود که اندازه تنفس برانگیخته خاک پتانسیل ریزجاندارهای زیموژن خاک (استراتژیست‌های-r) را برای تخریب بسترهای ساده نشان می‌دهد (اندرسون و دامش، 1978). روش اندازه‌گیری تنفس ناشی از بستر (تنفس برانگیخته) فرض می‌کند که نسبت ریزجاندارهایی که قادر به تجزیه گلوکز هستند در هر خاک یکسان است (اندرسون و دامش، 1978)، اما این می‌تواند در مورد هر گونه خاک درست نباشد (کلیمک، 2012). همان‌طور که لیتا و همکاران (1995) در آزمایشی با خاک آلوده به فلز

نشان دادند، پوسیدگی سلول ریزجاندارهای مرده می‌تواند به‌گونه معنی داری سرعت تنفس خاک را افزایش دهد. صفری سنجانی و یونسی (2017) نشان دادند اگرچه تعداد کل باکتری‌های قابل کشت در خاک‌های کشاورزی زیاد بود، اما تعداد نسبی باکتری‌های مقاوم به فلز و پادزیست در پسماندهای معدنی به شدت آلوده به‌گونه معنی داری بیشتر بود. در بازه زمانی میان‌مدت (15 و 30 روز) ترتیب اندازه تنفس برانگیخته به شکل خاک معدن≈خاک چراگاه>خاک کشاورزی بود. در بازه زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) ترتیب اندازه تنفس برانگیخته به شکل خاک کشاورزی≈خاک معدن>خاک چراگاه بود.

یافته‌های آزمون میانگین تنفس برانگیخته در زمان گرماگذاری 90 روزه در اثر متقابل گونه پادزیست و زمان (جدول 5) نشان داد که بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته در تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) به اندازه 0/0184 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت و کم‌ترین اندازه آن در تیمارهای بدون پادزیست، 200 و 100 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین در بازه زمانی میان‌مدت، 200 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم در بازه زمانی میان‌مدت، 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول در بازه زمانی بلندمدت و میان‌مدت، 100 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم در بازه زمانی میان‌مدت و 200 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم در بازه زمانی بلندمدت به دنبال هم به اندازه‌های 0/00891، 0/00956، 0/00967، 0/01005، 0/01007، 0/01023، 0/01029 و 0/01038 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت دیده شد. در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) در همه تیمارهای کاربرد پادزیست اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه کاهش یافت بجز تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول که معنی دار نبود، و کم‌ترین اندازه آن در تیمار کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم بود. در بازه زمانی میان‌مدت (15 و 30 روز) در همه تیمارهای کاربرد پادزیست اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه بهبود یافت ولی معنی دار نبود و بیش‌ترین آن در تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول بود. در بازه زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) در همه تیمارهای کاربرد پادزیست اندازه تنفس برانگیخته در برابر گواه کاهش یافت که تنها کاهش در دو تیمار کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم و مترونیدازول معنی دار بود. بر پایه یافته‌ها، کاربرد همه تیمارها مانند گواه در سه بازه زمانی کوتاه‌مدت، میان‌مدت و بلندمدت به ترتیب کاهش و سپس افزایش دوباره را در اندازه تنفس برانگیخته نشان دادند، بجز در تیمار کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول که در زمان گرماگذاری 90 روزه روند کاهشی را نشان داد.

یافته‌های آزمون میانگین تنفس برانگیخته در زمان گرماگذاری 90 روزه در اثر متقابل گونه خاک، پادزیست و زمان (جدول 5) نشان داد که بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته در تیمار کاربرد 100 میلی‌گرم مترونیدازول در کیلوگرم خاک چراگاه در بازه زمانی کوتاه‌مدت (صفر تا 7 روز) به اندازه 0/0251 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت و کم‌ترین اندازه آن در تیمارهای کاربرد 100 میلی‌گرم آموکسی‌سیلین در کیلوگرم خاک کشاورزی در بازه زمانی میان‌مدت (15 و 30 روز) به‌دست آمد. تنفس برانگیخته در کاربرد 200 میلی‌گرم مترونیدازول در کیلوگرم خاک چراگاه در بازه زمانی بلندمدت (60 و 90 روز) و گواه خاک کشاورزی در بازه زمانی میان‌مدت به دنبال هم به اندازه 0/0027، 0/0030 و 0/0032 میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت بود.

جدول 5- آزمون میانگین تنفس برانگیخته (میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در گرم خاک خشک در ساعت) ریزجانداران خاک در اثر اصلی زمان گرماگذاری، اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست و اثر متقابل سه‌گانه خاک، پادزیست و زمان گرماگذاری

اثر متقابل سه‌گانه خاک، پادزیست و زمان گرماگذاری					
گونه خاک	گونه پادزیست (میلی‌گرم پادزیست در کیلوگرم خاک خشک)	زمان گرماگذاری			اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست
		کوتاه مدت (صفر تا 7 روز)	میان مدت (15 و 30 روز)	بلند مدت (60 و 90 روز)	
کشاورزی	گواه بدون پادزیست	0/0128±0/0000 c-L	0/0032±0/0012 L	0/0126±0/0035 c-L	0/0095±0/0051 b-d
	آموکسی‌سیلین (100)	0/0075±0/0002 g-L	0/0027±0/0014 L	0/0186±0/0082 a-f	0/0096±0/0082 b-d
	آموکسی‌سیلین (200)	0/0065±0/0004 h-L	0/0046±0/0012 k-L	0/0142±0/0083 a-k	0/0085±0/0061 cd
	سفیکسیم (100)	0/0068±0/0006 h-L	0/0053±0/0000 j-L	0/0147±0/0025 a-k	0/0089±0/0046 cd
	سفیکسیم (200)	0/0060±0/0006 i-L	0/0056±0/0018 j-L	0/0134±0/0065 b-L	0/0083±0/0051 d
	مترونیدازول (100)	0/0134±0/0019 b-L	0/0097±0/0032 e-L	0/0233±0/0043 a-c	0/0155±0/0067 a
	مترونیدازول (200)	0/0118±0/0019 d-L	0/0054±0/0009 j-L	0/0124±0/0052 c-L	0/0099±0/0043 b-d
معدن	گواه بدون پادزیست	0/0124±0/0001 c-L	0/0122±0/0018 d-L	0/0191±0/0059 a-e	0/0146±0/0045 ab
	آموکسی‌سیلین (100)	0/0170±0/0013 a-i	0/0131±0/0010 b-L	0/0167±0/0055 a-i	0/0156±0/0034 a
	آموکسی‌سیلین (200)	0/0132±0/0007 b-L	0/0115±0/0020 e-L	0/0155±0/0089 a-k	0/0134±0/0049 a-d
	سفیکسیم (100)	0/0150±0/0007 a-k	0/0134±0/0013 b-L	0/0120±0/0033 d-L	0/0135±0/0022 a-d
	سفیکسیم (200)	0/0155±0/0018 a-k	0/0116±0/0007 d-L	0/0097±0/0051 e-L	0/0123±0/0037 a-d
	مترونیدازول (100)	0/0167±0/0015 a-i	0/0126±0/0014 c-L	0/0080±0/0045 f-L	0/0124±0/0045 a-d
	مترونیدازول (200)	0/0143±0/0003 a-k	0/0127±0/0009 c-L	0/0147±0/0095 a-k	0/0139±0/0048 a-c
چراگاه	گواه بدون پادزیست	0/0240±0/0008 ab	0/0112±0/0024 e-L	0/0161±0/0032 a-j	0/0171±0/0059 a
	آموکسی‌سیلین (100)	0/0181±0/0005 a-g	0/0130±0/0025 c-L	0/0049±0/0011 k-L	0/0120±0/0059 a-d
	آموکسی‌سیلین (200)	0/0192±0/0018 a-e	0/0124±0/0006 c-L	0/0062±0/0006 i-L	0/0126±0/0057 a-d
	سفیکسیم (100)	0/0190±0/0010 a-e	0/0121±0/0014 d-L	0/0051±0/0008 k-L	0/0121±0/0061 a-d
	سفیکسیم (200)	0/0173±0/0006 a-h	0/0128±0/0004 c-L	0/0079±0/0013 f-L	0/0127±0/0041 a-d
	مترونیدازول (100)	0/0251±0/0010 a	0/0130±0/0006 c-L	0/0056±0/0028 j-L	0/0146±0/0086 ab
	مترونیدازول (200)	0/0226±0/0016 a-d	0/0125±0/0007 c-L	0/0030±0/0009 L	0/0127±0/0085 a-d
اثر اصلی زمان گرماگذاری		0/0150±0/0054 A	0/0100±0/0039 C	0/0121±0/0068 B	

میانگین‌های دارای حرف های یکسان در هر یک از اثر اصلی و اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه ناهمانندی معنی داری در پایه آماری پنج درسد ندارند.

نشان تیمارها بر لگاریتم فراوانی همه باکتری های خاک

تجزیه واریانس نشان داد که پیامد گونه خاک، گونه پادزیست و زمان گرماگذاری بر لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک از دیدگاه آماری معنی دار بود. نشانه‌ی اثر متقابل دوگانه گونه خاک و پادزیست، گونه خاک و زمان گرماگذاری، و گونه پادزیست و زمان گرماگذاری و نیز اثر متقابل سه گانه تیمارها پیامد معنی داری بر فراوانی همه باکتری‌های خاک داشتند. ($P<0.01$، جدول6).

آزمون میانگین لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک در تیمارهای اثر متقابل سه گانه گونه خاک، گونه پادزیست و زمان گرماگذاری (جدول6) نشان داد که در خاک کشاورزی کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین در بازه زمانی میان مدت (15 و 30 روز)، مایه بیش‌ترین افزایش ($\log CFU.g^{-1}dry\ soil$ 0/29 ± 8/49) فراوانی همه باکتری‌های شمارش شده در خاک گردید، که ناهمانندی معنی داری با همه تیمارهای خاک کشاورزی و چراگاه (بجزگواه) در همان بازه زمانی را نداشت. در بازه زمانی کوتاه مدت (صفر تا 7 روز) کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول در خاک کشاورزی و نیز گواه و تیمار آموکسی‌سیلین (هر دو

اندازه) در خاک چراگاه ناهمانندی معنی داری با تیمار دارای بیش‌ترین فراوانی همه باکتری‌های خاک را نداشتند. در خاک معدن کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم مترونیدازول در بازه زمانی میان مدت (15 و 30 روز)، بیش‌ترین پیامد بازدارندگی بر رشد همه باکتری‌ها را داشت، که ناهمانندی معنی داری با همه تیمارهای خاک معدن (بجز تیمار 200 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلن) در بازه زمانی بلند مدت (60 و 90 روز) را نداشت.

جدول 6- آزمون میانگین فراوانی همه باکتری‌های خاک در اثر متقابل سه‌گانه خاک، پادزیست و زمان؛ اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست و اثر اصلی زمان گرماگذاری (Log CFU Bacteria. g^{-1} dry soil)

گونه خاک	گونه پادزیست (میلی‌گرم پادزیست در کیلوگرم خاک خشک)	اثر متقابل سه‌گانه خاک، پادزیست و زمان			اثر متقابل دوگانه خاک و پادزیست
		زمان گرماگذاری			
		کوتاه مدت (صفر تا 7 روز)	میان مدت (15 و 30 روز)	بلند مدت (60 و 90 روز)	
کشاورزی	گواه بدون پادزیست	7/45 ± 0/07 d-L	7/63 ± 0/44 a-j	7/03 ± 0/24 f-p	7/37 ± 0/36 a
	آموکسی‌سیلین (100)	7/25 ± 0/09 c-m	8/39 ± 0/31 ab	6/74 ± 0/36 i-r	7/46 ± 0/77 a
	آموکسی‌سیلین (200)	7/20 ± 0/05 d-m	8/49 ± 0/29 a	6/94 ± 0/14 g-p	7/54 ± 0/73 a
	سفیکسیم (100)	7/01 ± 0/07 f-p	7/66 ± 0/35 a-i	6/88 ± 0/10 g-r	7/18 ± 0/40 a
	سفیکسیم (200)	7/06 ± 0/03 f-o	7/81 ± 0/41 a-g	6/84 ± 0/21 g-r	7/24 ± 0/49 a
	مترونیدازول (100)	7/17 ± 0/02 d-m	7/77 ± 0/40 a-g	6/85 ± 0/16 g-r	7/27 ± 0/46 a
	مترونیدازول (200)	7/53 ± 0/25 a-k	7/75 ± 0/67 a-h	6/90 ± 0/12 g-q	7/39 ± 0/52 a
معدن	گواه بدون پادزیست	6/00 ± 0/23 q-v	5/90 ± 0/18 r-w	4/73 ± 0/37 xy	5/54 ± 0/65 cd
	آموکسی‌سیلین (100)	6/49 ± 0/20 L-u	5/67 ± 0/10 t-x	4/95 ± 0/22 w-y	5/70 ± 0/68 c
	آموکسی‌سیلین (200)	6/61 ± 0/17 k-t	6/64 ± 0/32 j-t	5/59 ± 0/49 u-x	6/28 ± 0/60 b
	سفیکسیم (100)	5/69 ± 0/26 s-x	6/27 ± 0/28 m-u	4/79 ± 0/20 xy	5/58 ± 0/68 cd
	سفیکسیم (200)	6/27 ± 0/23 m-u	6/06 ± 0/06 o-v	5/15 ± 0/31 v-y	5/83 ± 0/55 bc
	مترونیدازول (100)	6/05 ± 0/02 p-v	5/70 ± 0/17 s-x	4/87 ± 0/32 xy	5/54 ± 0/55 cd
	مترونیدازول (200)	6/13 ± 0/21 n-v	4/45 ± 0/00 y	4/94 ± 0/07 w-y	5/17 ± 0/75 d
چراگاه	گواه بدون پادزیست	7/51 ± 0/15 a-k	7/19 ± 1/16 d-m	6/59 ± 0/21 k-t	7/10 ± 0/72 a
	آموکسی‌سیلین (100)	8/01 ± 0/07 a-f	7/66 ± 0/33 a-i	6/68 ± 0/04 i-s	7/45 ± 0/62 a
	آموکسی‌سیلین (200)	7/78 ± 0/17 a-g	8/06 ± 0/27 a-e	6/56 ± 0/08 k-u	7/47 ± 0/70 a
	سفیکسیم (100)	7/36 ± 0/27 c-L	8/21 ± 0/14 a-c	6/85 ± 0/12 g-r	7/47 ± 0/61 a
	سفیکسیم (200)	7/22 ± 0/11 c-m	8/12 ± 0/60 a-d	6/82 ± 0/15 g-r	7/39 ± 0/65 a
	مترونیدازول (100)	7/10 ± 0/15 e-n	7/65 ± 0/30 a-i	6/77 ± 0/06 h-r	7/17 ± 0/42 a
	مترونیدازول (200)	7/30 ± 0/03 c-L	7/99 ± 0/21 a-f	6/71 ± 0/16 i-r	7/33 ± 0/56 a
اثر اصلی زمان گرماگذاری		6/96 ± 0/63 B	7/19 ± 1/13 A	6/20 ± 0/89 C	

میانگین‌های دارای حرف های یکسان در هر اثر اصلی و اثر متقابل دوگانه و سه گانه ناهمانندی معنی داری در پایه آماری پنج درسد ندارند.

آزمون میانگین لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک در تیمارهای اثر متقابل گونه خاک و پادزیست (جدول6) نشان داد که در خاک معدن بهره‌گیری از پادزیست مترونیدازول (200 میلی‌گرم بر کیلوگرم)، بیش‌ترین پیامد بد را بر لگاریتم فراوانی همه باکتری‌های خاک داشت، که ناهمانندی معنی داری با گواه و کاربرد 100 میلی‌گرم در کیلوگرم سفیکسیم و مترونیدازول نداشت. کاربرد 200 میلی‌گرم در کیلوگرم آموکسی‌سیلین در خاک کشاورزی بیش‌ترین فراوانی همه باکتری‌های خاک را داشت (7/54 ± 0/73 log CFU.g^{-1}dry soil) که تیمارهای گواه و پادزیست‌ها در دو خاک کشاورزی و چراگاه همان پیامد را نشان دادند. در زمان گرماگذاری

میان مدت (بازه 15 و 30 روز)، فراوانی همه باکتری‌ها به گونه معنی داری افزایش پیدا کرد (log CFU.g^{-1}dry soil 1/13 ± 7/19). بازه زمانی بلند مدت (60 و 90 روز) بیش‌ترین کاهش را در فراوانی همه باکتری‌های خاک داشت (جدول6).

بحث

تنفس پایه

تنفس پایه یکی از شناسه‌های زیستی برای ارزیابی کارکرد ریزجانداران خاک است که نشان از واکنش آن‌ها به تنش‌های درون خاک و دشواری‌های خاک به‌ویژه کمبود مواد آلی در خاک دارد. از این فراسنجه به گونه گسترده‌ای برای ارزیابی پیامد آلاینده‌هایی مانند فلزهای سنگین بر میکروبیوتای خاک بهره‌گیری شده است (بوگرا و همکاران 2022). در این پژوهش خاک چراگاه بالاترین اندازه تنفس پایه و خاک معدن کم‌ترین آن را داشت. خاک چراگاه بااین‌که همانند خاک معدن آلوده به فلزهای سنگین است ولی با داشتن کربن آلی بیش‌تر از خاک کشاورزی زیستگاه بهتری برای تنفس ریزجانداران فراهم کرده است. این نشان می‌دهد ریزجانداران درون خاک بیش‌تر از کمبود کربن آلی آسیب می‌بینند. در برابر آن زهری بودن و تنش آلودگی خاک با فلزهای سنگین پیامد چندانی بر کارکرد ریزجانداران خاک نداشته است.

تیله- برون و بک (2005) گزارش کردند که در زمان اندازه‌گیری تنفس پایه خاک بودن پادزیست‌های باکتریواستاتیک که مایه مهار باکتری یا جلوگیری از فراوان شدن باکتری و نه کشتن آن می شود، نمی‌تواند بر تنفس باکتری پیامد داشته باشد، مگر اینکه رشد باکتری رخ دهد. برای آسیب پادزیست بر ریزجانداران، جابجایی آن به درون یاخته باکتری باید انجام شود. پس هنگامی که ریزجانداران خاک کاراتر هستند، پیامد پادزیست‌ها نمایان‌تر است. در این پژوهش کاربرد هر سه پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول مایه بهبود تنفس پایه ریزجانداران خاک شد. به‌ویژه در کاربرد 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم مترونیدازول بیش‌ترین اندازه تنفس پایه اندازه‌گیری شد. این می‌تواند وابسته به مرگ گروهی از ریزجانداران و بهبود خاک با افزایش مواد آلی آن‌ها و اثر متقابل زیان‌بار آن‌ها برای ریزجانداران دیگر باشد. در شمارش ریزجانداران گوناگون خاک دیده شد که فراوانی قارچ‌ها در این تیمار افزایش معنی داری دارد (داده‌ها در این پژوهش آورده نشده است).

خو و همکاران (2016) در پژوهش خود نشان دادند که کاربرد فلز مس و پادزیست سولفادیازین در خاک در آغاز دوره گرماگذاری مایه کاهش تنفس پایه خاک می‌شود که می‌تواند وابسته به مرگ و میر یا کاهش زیست توده ریزجانداران پاسخ‌دهنده به آن باشد. نشان بازدارندگی مس و سولفادیازین در پایان دوره گرماگذاری ناپدید شد یا وارونه گشت، که آن را وابسته به کاهش زیست فراهمی مس و سولفادیازین و یا سازگاری ریزجانداران دانسته‌اند و دلیل دیگر آن شاید دگرش کارکرد ریزجانداران باشد که با دگرگونی ساختار جامعه ریزجانداران خاک پدید آمده است. در این پژوهش اندازه تنفس پایه خاک با گذشت زمان کاهش یافت این کاهش می‌تواند وابسته به کاهش کربن آلی به‌ویژه ریخت فراهم و ساده آن در زمان نگهداری 90 روزه باشد.

خو و همکاران (2016) همچنین در پژوهش خود نشان دادند که تیمارهای هم‌زمان فلز سنگین با پادزیست در گرماگذاری‌ها آسیب بیشتری برای ریزجانداران و کارکرد آن‌ها داشته است. این شاید وابسته به افزایش زیست فراهمی پادزیست سولفادیازین در کنار فلز مس باشد و یا شاید وابسته به افزایش زهری بودن پادزیست سولفادیازین در کنار فلز مس برای یاخته باکتریایی باشد. همچنین گزارش شده است که برخی از کمپلکس‌های سولفونامیدها و فلزها آسیب بیشتری برای باکتری‌ها دارند. در این پژوهش دیده شد که در اثر متقابل خاک و زمان در خاک‌های کشاورزی و چراگاه اندازه تنفس پایه با زمان کاهش یافت، ولی در خاک معدن در آغاز افزایش و سپس کاهش یافت. این شاید وابسته به

ناهمانندی گروه‌های ریزجانداران در دو خاک و پاسخ ناهمانند آن‌ها به پادزیست‌ها باشد. صفری سنجانی و یونسی (2017) نشان دادند که فراوانی و کارکرد باکتری-های پایدار در برابر پادزیست‌ها در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین بیشتر از خاک‌های ناآلوده است. در پژوهشی لی و همکاران (2022) با افزودن پادزیست داکسی‌سایکلین و فلزهای سنگین روی و مس برابر اندازه‌ای که کود خوک به خاک کشاورزی می‌افزاید، دریافتند که افزودن روی و مس به خاک مایه کاهش تندی تنفس به ویژه در آغاز دوره گرماگذاری (پیش از 20 روز) می‌شود. اگر چه pH و هدایت الکتریکی در خاکی که غلظت بالای مس را دریافت کرده بود به اندازه خاکی که غلظت بالای روی را دریافت کرده بود دگرش نیافت، ولی مهار تنفس خاک با افزودن غلظت بالای مس بیش‌تر بود. غلظت کم داکسی‌سایکلین تنفس خاک را افزایش داد، ولی دوز بالای آن در آغاز دوره گرماگذاری تنفس خاک را مهار کرد. این می‌تواند وابسته به فرآیند هورمسیس باشد (هورمسیس فرایندی است که یک یاخته، ارگانیسم یا گروهی از ریزجانداران زنده پاسخ دوگانه از خود در برابر اندازه فزاینده از یک ماده یا شرایط ویژه شیمیایی نشان می‌دهند. آن‌ها در دوزهای پایین پاسخ افزایندگی یا سودمند و در دوزهای بالا پاسخ مهاری یا کاهشی نشان می‌دهند).

در آزمایش مارتینز (2009) دوز پایین داکسی‌سایکلین (یک میلی‌گرم در کیلوگرم) مایه افزایش و دوز بالای آن (15 میلی‌گرم در کیلوگرم) مایه مهار ریزجانداران شد. دیگر پژوهش‌گران دریافتند که غلظت بالای روی با آسیب رساندن به DNA و غشای یاخته، باکتری‌ها را می‌کشد (تونگی و همکاران، 2020) و مس توان سمی بودن نیرومندتری دارد که با برانگیختن رادیکال‌های آزاد مانند ROS، به پرده سیتوپلاسمی و DNA یاخته آسیب می‌زند (دوپون و همکاران، 2011؛ پروین و همکاران، 2018). پژوهش لی و همکاران (2022) نشان داد که افزودن غلظت‌های بالای داکسی‌سایکلین در برابر روی و مس پیامد معنی داری بر گوناگونی ریزجانداران در مرز فیلوم (شاخه) نداشت. این نشان می‌دهد که روی و مس در برابر پادزیست داکسی‌سایکلین می‌توانند فشار بیشتری بر باکتری‌های خاک داشته باشند که این یافته‌ها با یافته‌های تنفس پایه اندازه‌گیری شده هم‌خوانی داشت.

همان‌گونه که دیده شد، افزودن پادزیست‌ها در خاک روهم‌رفته مایه افزایش تنفس پایه خاک شد. این افزایش از دو راه می‌تواند رخ دهد. فروزینگی زیستی پادزیست و از سوی دیگر مرگ برخی باکتری‌ها و فراوان شدن کربن آلی برای گروه‌های پایدار می‌تواند مایه رخداد این پدیده شده باشد. باتلر و همکاران (2011) گزارش کردند از آن‌جایی‌که اندازه تنفس پایه در برابر تنفس برانگیخته کم است، انگیزش تنفس پایه با کاربرد دوز دوم تریکلوزان می‌تواند وابسته به بهره‌گیری باکتری‌های پایدار به تریکلوزان از این پادزیست باشد. باکتری‌های دارای آنزیم تجزیه کننده تریکلوزان در پاسخ به افزودن آن به خاک تنفس پایه بیشتری داشتند.. از سوی دیگر افزایش تنفس پایه خاک می‌تواند وابسته به تنش و یا کانی شدن توده ریزجانداران مرده با ریزجانداران پایدار و مانده باشد.

تنفس برانگیخته با سوبسترا

تنفس برانگیخته با سوبسترا که بیش‌تر برای ارزیابی توده زیستی ریزجانداران کارا در خاک بهره‌گیری می‌شود (اندرسون و دامش، 1978) همانند یکی از شناسه‌های کلیدی کیفیت خاک به‌ویژه خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین بررسی می‌شود (ژانگ و همکاران، 2022). در این پژوهش همانند آنچه در بررسی تنفس پایه دیده شد خاک چراگاه بالاترین و خاک معدن کم‌ترین تنفس برانگیخته را داشت. این بار دیگر نشان می‌دهد که در این خاک‌ها کمبود ماده آلی در برابر آلودگی خاک تنش بیش‌تری بر ریزجانداران آن دارد، زیرا آلودگی خاک چراگاه به فلزهای سنگین کم‌تر از خاک معدن ولی به اندازه معنی داری بیش‌تر از خاک کشاورزی است.

همانند با پژوهش‌های پیشین پاسخ‌دهی تنفس برانگیخته به تیمارهای بررسی شده بیش‌تر از تنفس پایه بود. گزارش شده است که بیش‌تر ریزجاندارانی که در خاک تنفس دارند، به گونه خفته هستند و تنفس را با اکسید کردن خاستگاه انرژی درون یاخته‌ای انجام می‌دهند. این پژوهش‌گران گزارش کردند شاید برای همین است که در خاک پس از افزودن پادزیست تنفس پایه کمتر پاسخ می‌دهد ولی هنگامی که یک بستره آلی به خاک افزوده می‌شود و ریزجانداران کارا می‌شوند، اثر پادزیست‌ها نمایان‌تر دیده می‌شود.

در این پژوهش در بررسی اثر متقابل پادزیست و زمان، بجز سفیکسیم (200 میلی‌گرم در کیلوگرم) و مترونیدازول (100 و 200 میلی‌گرم در کیلوگرم) که اندازه تنفس برانگیخته را هم‌چنان تا پایان دوره گرماگذاری کاهش دادند، پادزیست‌های آموکسی‌سیلین و سفیکسیم در آغاز مایه کاهش و سپس مایه افزایش تنفس برانگیخته شدند. این یافته می‌تواند وابسته به کارا بودن ریزجانداران در روزهای آغازین و کم‌کار شدن آن‌ها در روزهای پایانی آزمایش باشد. باتلر و همکاران (2011) گزارش کردند پاسخ تنفس برانگیخته به کاربرد دوز دوم تریکلوزان کمتر است که نشان می‌دهد شاید همه زیست توده ریزجانداران با به‌کار بردن دوز دوم تریکلوزان کاهش یافته است. این می تواند وابسته به دگرش گروه‌ها و گوناگونی ریزجانداران خاک وابسته باشد تا جایی که گاهی کارکردهای ریزجانداران با افزودن دوباره تریکلوزان افزایش می‌یابد. این نشان‌دهنده برگشت‌پذیری ریزجانداران خاک در برابر این گونه آشفتگی و تنش‌ها همراه با سازگاری آن‌ها است. آن‌ها گزارش کرده‌اند که توان مهارکنندگی پادزیست‌ها گذشته از پاسخ‌دهی ریزجانداران بستگی به ویژگی‌های گوناگون خاک به‌ویژه کربن آلی، درسد رس و پی- اچ آن دارد.

در بررسی اثر اصلی خاک، همان‌گونه که دیده شد، خاک معدن و چراگاه بیش‌ترین اندازه تنفس برانگیخته را داشتند. باتلر و همکاران (2011) نشان دادند که با افزودن تریکلوزان، مهار تنفس پایه و تنفس برانگیخته در خاک رسی کمتر و تندی بازیابی آن نیز تندتر بود. آن‌ها گزارش کردند اگرچه این پیامد می‌تواند نشان‌دهنده درجه بالای پایداری ریزجانداران و برگشت‌پذیری آن‌ها باشد ولی می‌تواند وابسته به فراهمی زیستی کمتر تریکلوزان در خاک رسی در برابر دو خاک دیگر (لوم شنی و شن لومی) نیز باشد.

کانکل و وایت (2012) گزارش کردند بهبودی تندی تنفس خاک در تیمار با پازیست سولفامتوکسازول با زمان می‌تواند وابسته به دست‌کم یکی از شیوه‌های زیر باشد: (1) دگرش در آمیزه و گوناگونی ریزجانداران خاک از پاسخ‌دهنده به ریزجانداران پایدار به پادزیست، (2) زمان پیامد پادزیست بر ریزجاندار کوتاه بوده و همیشگی نیست به گونه‌ای که با گذشت زمان ریزجانداران توان پایداری را پیدا می‌کنند و (3) پازیست به اندازه فراوانی با خاک واکنش داده و ناکارآمد می شود تا از پیامد بیش‌تر پادزیست به ریزجانداران جلوگیری شود.

فراوانی همه باکتری‌های خاک

کاربرد آموکسی‌سیلین در زمان گرماگذاری میان‌مدت خاک کشاورزی بالاترین فراوانی همه باکتری‌ها را نشان داد، چنان‌چه در پژوهش صفری سنجانی و یونسی (2017) بیان شد باکتری‌های جدا شده از خاک‌های کشاورزی اغلب به چند پادزیست پایدار بودند. در بررسی‌های رشتبری (1399) آمده است که کاهش پیامد بد پادزیست‌ها بر ریزجانداران خاک و کارکرد آن‌ها به جذب فیزیکوشیمیایی پادزیست‌ها و کاهش پادزیست‌های محلول در آب بستگی دارد که مایه کمتر شدن پیامد زهری و افزایش پایداری پادزیستی می‌شود. بینه و همکاران (2007) نشان دادند که لگاریتم فراوانی همه باکتری‌ها و نیز باکتری‌های پایدار به آموکسی‌سیلین در خاک کود داده شده به گونه معنی داری بالاتر از خاک تیمار نشده با کوددامی بود. هویر و اسملا (2007) بیان کردند احتمالاً مواد مغذی کود امکان غنی‌سازی جمعیت‌های پایدار به پادزیست را در حضور کود فراهم

می‌کند، در خاکی که به گونه دوره‌ای کود دریافت می‌کند ممکن است ژن‌های پایداری پادزیستی انباشه شده باشد. در این پژوهش خاک چراگاه ناهمانندی معنی داری با خاک کشاورزی در بالاترین فراوانی همه باکتری‌های خاک نداشت. حیدری و همکاران (2022) نشان دادند که فراوانی همه باکتری‌های خاک در خاک چراگاه و کشاورزی در هر دو تاریخ نمونه‌برداری (فوریه و آگوست) بیشتر از خاک کنترل بود. هم‌چنین بیان کردند که نسبت باکتری‌های پایدار به پادزیست/ همه باکتری‌های خاک، در خاک چراگاه بالاتر از خاک کشاورزی است. دلیل آن را چنین بیان کردند که اندازه بالاتر کادمیوم و روی در خاک‌های چراگاه و سطوح بالاتر پایداری به این فلزهای سنگین می‌تواند باعث انتخاب هم‌زمان پایداری به این پادزیست‌ها شود. گزارش‌های پیشین نشان می‌دهند که ژن‌های پایداری هم-تنظیم می‌تواند ایجاد شده باشد (لی و همکاران، 2017؛ ژائو و همکاران، 2019). انتقال افقی ژن از راه عناصر ژنتیکی متحرک باکتریایی یک روش مهم انتشار ژن‌های مقاومت فلزهای سنگین و پایداری پادزیستی است (لو و لو، 2019). پژوهش دینگ و هی (2010) نشان داد که جامعه باکتریایی خاکی با درسد رس بالا بیش‌تر از خاک‌های دیگر با pH پایین و اسیدهیومیک بالاتر تحت تأثیر لینکومایسین قرار گرفت. بنابراین، pH و اندازه اسیدهیومیک می‌تواند نقش مهمی در کم کردن اثر پادزیست داشته باشد (برای مثال، با غیر فعال کردن پادزیست‌ها). در مطالعه وانگ و همکاران (2009)، جذب وابسته به pH برای لینکومایسین مشاهده شد و با افزایش pH محلول، جذب لینکومایسین کاهش یافت. تعدادی از پژوهش‌ها نشان دادند که جذب می‌تواند مایه کاهش (تیله برون، 2005؛ کوردووا-کریلوس و اسکو 2007؛ کوتزرکه و همکاران 2008) یا ناپدید شدن (هاند رینکه و همکاران 2004) اثرات پادزیست بر جوامع ریزجانداری شود.

نتیجه‌گیری کلی

خاک چراگاه بیش‌ترین اندازه تنفس‌پایه را داشت و خاک معدن بالاترین اندازه تنفس برانگیخته را نشان داد. خاک کشاورزی کم‌ترین اندازه تنفس پایه و برانگیخته را داشت. کاربرد مترونیدازول بیش‌ترین اندازه تنفس‌پایه و برانگیخته را نشان داد، در حالیکه کاربرد سفیکسیم کم‌ترین اندازه تنفس برانگیخته را داشت. گرماگذاری در بازه زمانی کوتاه‌مدت بیش‌ترین اندازه تنفس‌پایه و برانگیخته را نشان داد و بازه زمانی میان‌مدت کم‌ترین اندازه تنفس برانگیخته را داشت. بالاترین اندازه تنفس‌پایه و برانگیخته در خاک چراگاه در بازه زمانی کوتاه‌مدت دیده شد، و کم‌ترین اندازه تنفس‌پایه در خاک کشاورزی در بازه زمانی بلندمدت بود. بیش‌ترین فراوانی باکتری در گرماگذاری میان مدت با کاربرد آموکسی‌سیلین در خاک کشاورزی بود و کم‌ترین اندازه آن در همان بازه زمانی با کاربرد مترونیدازول در خاک معدن دیده شد.

این یافته‌ها نشان می‌دهند که تنفس پایه و برانگیخته یا کارکرد و فراوانی زیست توده ریزجانداران در خاک‌های بررسی شده وابستگی کمی به آلودگی فلزی خاک دارد. در میان پادزیست‌های بررسی شده تنش آموکسی‌سیلین کمتر و تنش مترونیدازول بیش‌ترین بوده است.

فهرست منابع:

1. رشتبری، م. 1399. پیامد کاربرد پادزیست‌ها و بهسازهای بیوچار و نانوزئولیت بر کارکرد ریزجانداران خاک و برهمکنش‌های زیستی گیاه نخود (Cicer arietinum L.). رساله دکتری تخصصی رشته علوم خاک- بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه آموزشی علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
۲. صفری سنجانی، ع.ا.، شریفی، ز.، صفری سنجانی، م. 1389. روش‌های آزمایشگاهی در میکروبیولوژی. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا، 562 صفحه.

3. Alef, K. Nannipieri, P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic press.
4. Alexy, R. Kümpel, T. and Kümmerer, K. 2004. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. Chemosphere 57(6):505-512.
5. Aminiyan, M. M., Hosseini, H., and Heydariyan, A. 2018. Microbial communities and their characteristics in a soil amended by nanozeolite and some plant residues: Short time in-situ incubation. Eurasian Journal of Soil Science 7(1):9-19.
6. Ananyeva, N.D. Susyan, E.A. Chernova, O.V. and Wirth, S. 2008. Microbial respiration activities of soils from different climatic regions of European Russia. Eur. J. Soil Biol 44:147–157.
7. Anderson, J.P.E. and Domsch, K.H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem 10(3):215–221.
8. Binh, C. T. T. Heuer, H. Gomes, N. C. M. Kotzerke, A. Fulle, M. Wilke, B. M. ... and Smalla, K. 2007. Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. FEMS microbiology ecology 62(3):290-302.
9. Blackwell, P. A. Boxall, A. B. Kay, P. and Noble, H. 2005. Evaluation of a lower tier exposure assessment model for veterinary medicines. Journal of agricultural and food chemistry 53(6):2192-2201.
10. Bouguerra, S. Gavina, A. Natal-da-Luz, T. Sousa, J. P. Ksibi, M. and Pereira, R. 2022. The use of soil enzymes activity, microbial biomass, and basal respiration to assess the effects of cobalt oxide nanomaterial in soil microbiota. Applied Soil Ecology 169:104246.
11. Bower, C. A. Reitemeier, R. F. and Fireman, M. 1952. Exchangeable cation analysis of saline and alkali soils. Soil science 73(4):251-262.
12. Butler, E. Whelan, M. J. Ritz, K. Sakrabani, R. and Van Egmond, R. 2011. Effects of triclosan on soil microbial respiration. Environmental Toxicology and Chemistry 30(2):360-366.
13. Čermák, L. Kopecký, J. Novotná, J. Omelka, M. Parkhomenko, N. Plháčková, K. and Ságová-Marečková, M. 2008. Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment. Applied soil ecology 40(2):348-358.
14. Ciğeroğlu, Z. Küçükyıldız, G. Erim, B. and Alp, E. 2021. Easy preparation of magnetic nanoparticles-rGO-chitosan composite beads: Optimization study on cefixime removal based on RSM and ANN by using Genetic Algorithm Approach. Journal of Molecular Structure 1224,129182.
15. Conkle, J. L. and White, J. R. 2012. An initial screening of antibiotic effects on microbial respiration in wetland soils. Journal of Environmental Science and Health 47(10):1381–1390.
16. Cordova-Kreylos, A. L. and Scow, K. M. 2007. Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. The ISME journal 1(7):585-595.
17. de Souza, M.J. Nair, S. Loka Bharathi, P.A. and Chandramohan, D. 2006. Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic marine waters. Ecotoxicology 15(4):379–384.
18. Ding, C. and He, J. 2010. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Applied microbiology and biotechnology 87(3):925-941.
19. Doelman, P. and Haanstra, L. 1984. Short-term and long-term effects of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn on microbial respiration in relation to abiotic soil factors. Plant Soil 79:317-321.
20. Dupont, C. L. Grass, G. and Rensing, C. 2011. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications. Metallomics 3(11):1109-1118.

21. Gee, G. W. and Bauder, J. W. 1986. Particle-size analysis. p.383–411. A. Klute (ed.) Methods of soil analysis. Part 1. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI. Particle-size analysis p:383–411. In A. Klute (ed.) Methods of soil analysis. Part 1. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
22. Hammesfahr, U. Heuer, H. Manzke, B. Smalla, K. and Thiele-Bruhn, S. 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. Soil Biology and Biochemistry 40(7):1583-1591.
23. Helrich, K. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of official analytical chemists.
24. Heuer, H. and Smalla, K. 2007. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. Environmental microbiology 9(3):657-666.
25. Heydari, A. Kim, N. D. Horswell, J. Gielen, G. Siggins, A. Taylor, M. ... and Palmer, B. R. 2022. Co-Selection of Heavy Metal and Antibiotic Resistance in Soil Bacteria from Agricultural Soils in New Zealand. Sustainability 14(3):1790.
26. Hirsch, R. Ternes, T. Haberer, K. and Kratz, K. L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Science of the Total environment 225(1-2):109-118.
27. Hund-Rinke, K. Simon, M. and Lukow, T. 2004. Effects of tetracycline on the soil microflora: function, diversity, resistance. Journal of Soils and Sediments 4(1):11-16.
28. Klimek, B. 2012. Effect of long-term zinc pollution on soil microbial community resistance to repeated contamination. Bulletin of environmental contamination and toxicology 88(4):617-622.
29. Klute, A. 1986. Water retention: laboratory methods. Methods of soil analysis: Part 1 Physical and mineralogical methods 5:635-662.
30. Kong, W.D. Zhu, Y.G. Fu, B.J. Marschner, P. and He, J.Z. 2006. The veterinary antibiotics oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. Environ. Pollut 143(1):129–137.
31. Kotzerke, A. Sharma, S. Schauss, K. Heuer, H. Thiele-Bruhn, S. Smalla, K. ... and Schloter, M. 2008. Alterations in soil microbial activity and N-transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure. Environmental Pollution 153(2):315-322.
32. Kummerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. Chemosphere *75*:417–434.
33. Lamshöft, M. Sukul, P. Zühlke, S. and Spiteller, M. 2010. Behaviour of 14C-sulfadiazine and 14C-difloxacin during manure storage. Science of the Total Environment 408(7):1563-1568.
34. Leita, L. Denobili, M. Muhlbachova, G. Mondini, C. Marchiol, L. and Zerbi, G. 1995. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. Biol Fertil Soils 19:103–109.
35. Li, L. G. Xia, Y. and Zhang, T. 2017. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. The ISME journal 11(3):651-662.
36. Li, N. Chen, J. Liu, C. Yang, J. Zhu, C. and Li, H. 2022. Cu and Zn exert a greater influence on antibiotic resistance and its transfer than doxycycline in agricultural soils. Journal of Hazardous Materials 423:127042.
37. Liu, F. Ying, G.G. Tao, R. Jian-Liang, Z. Yang, J.F. and Zhao, L.F. 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. Environ. Pollut *157*:1636–1642.
38. Loeppert, R. H. and Suarez, D. L. 1996. Carbonate and gypsum. Methods of soil analysis Part 3:437-474.

39. Lu, X. M. and Lu, P. Z. 2019. Distribution of antibiotic resistance genes in soil amended using Azolla imbricata and its driving mechanisms. Science of The Total Environment 692:422-431.
40. Marabottini, R. Stazi, S. R. Papp, R. Grego, S. and Moscatelli, M. C. 2013. Mobility and distribution of arsenic in contaminated mine soils and its effects on the microbial pool. Ecotoxicology and environmental safety 96:147-153.
41. Martinez, J. L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environmental pollution 157(11):2893-2902.
42. Montforts, M. H. Kalf, D. F. van Vlaardingen, P. L. and Linders, J. B. 1999. The exposure assessment for veterinary medicinal products. Science of the total environment 225(1-2):119-133.
43. Murphy, J. A. M. E. S. and Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica chimica acta 27:31-36.
44. Ostermann, A. Gao, J. Welp, G. Siemens, J. Roelcke, M. Heimann, L. ... and Amelung, W. 2014. Identification of soil contamination hotspots with veterinary antibiotics using heavy metal concentrations and leaching data—a field study in China. Environmental monitoring and assessment 186(11):7693-7707.
45. Oves, M. and Hussain, F. M. 2016. Antibiotics and heavy metal resistance emergence in water borne bacteria. J Investig Genomics 3(2).
46. Parveen, S. Taranum, R. and Mittapally, S. 2018. Metal ions as antibacterial agents. J. Drug Deliv. Ther 8:411-419.
47. Pasamontes, A. and Callao, M. P. 2006. Sequential injection analysis for the simultaneous determination of clavulanic acid and amoxicillin in pharmaceuticals using second-order calibration. Analytical sciences 22(1):131-135.
48. Rhoades, J. D. 1996. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods 5:417-435.
49. Romero-Freire, A. Sierra Arag´on, M. Martínez Garz´on, F.J. and Martín Peinado, F.J. 2016. Is soil basal respiration a good indicator of soil pollution? Geoderma 263:132–139.
50. Safari Sinegani, A. A. and Younessi, N. 2017. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. Journal of global antimicrobial resistance 10:247-255.
51. Sager M. 2007. Trace and nutrient elements in manure, dung and compost samples in Austria. Soil Biology and Biochemistry 39:1383–1390.
52. Samanta, A. Bera, P. Khatun, M. A. H. A. M. U. D. A. Sinha, C. Pal, P. Lalee, A. and Mandal, A. 2012. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain Bacillus sp. isolated from municipal waste. Journal of Microbiology and Biotechnology Research 2(1):178-189.
53. Sepehr, M. N. Al-Musawi, T. J. Ghahramani, E. Kazemian, H. and Zarrabi, M. 2017. Adsorption performance of magnesium/aluminum layered double hydroxide nanoparticles for metronidazole from aqueous solution. Arabian Journal of Chemistry 10(5):611-623.
54. Seiler, C. and Berendonk, T. U. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. Frontiers in microbiology 3:399.
55. Sierra, J. Roig, N. Marti, E. Nadal, M. and Schuhmacher, M. 2012. Amendment of soils with composted sewage sludge. Long term effects on C and N transformation. In: Trasar-Cepeda, C. Hernandez, T. Garcia, C. Gonzalez-Carcedo, S. (Eds.), Soil Enzymology in the Recycling of Organic Wastes and Environmental Restoration. Springer-Verlag, Dordrecht, London, New York pp:51–62.

56. Sinegani, A. A. S. and Younessi, N. 2017. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. Journal of global antimicrobial resistance 10:247-255.
57. Sukul, P. Lamshöft, M. Kusari, S. Zühlke, S. and Spiteller, M. 2009. Metabolism and excretion kinetics of 14C-labeled and non-labeled difloxacin in pigs after oral administration, and antimicrobial activity of manure containing difloxacin and its metabolites. Environmental research 109(3):225-231.
58. Tai, D. T. Ngan, M. H. K. Hung, C. K. Thu, N. N. A. and Nhi, N. T. N. 2022. The impact of heavy metals to bacterial tolerance of antibiotic resistance and growth in the aquatic environment of Vietnam. Infect Dis Res 3(1):1.
59. Tang, Q. Xia, L. Ti, C. Zhou, W. Fountain, L. Shan, J. and Yan, X. 2020. Oxytetracycline, copper, and zinc effects on nitrification processes and microbial activity in two soil types. Food and Energy Security 9(4):e248.
60. Thiele-Bruhn, S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils–a review. Journal of plant nutrition and soil science 166(2):145-167.
61. Thiele-Bruhn, S. 2005. Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils—dose-response relations determined with the iron (III) reduction test. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal 24(4):869-876.
62. Thiele-Bruhn, S. and Beck, I. C. 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. Chemosphere 59(4):457-465.
63. Thomas, G. Sparks, D. Page, A. Helmke, P. Loeppert, R. Soltanpour, P. Tabatabai, M. Johnston, C. and Sumner, M. 1996. "Soil pH and soil acidity. Methods of soil analysis Part 3-chemical methods" SSSA Book Series 5.3 pp:475-490.
64. Tobor-Kapłon, M. A. Bloem, J. Romkens, P. F. and Ruiter, P. D. 2005. Functional stability of microbial communities in contaminated soils. Oikos 111(1):119–129.
65. Tongyi, Y. Yanpeng, L. Xingang, W. Fen, Y. Jun, L. and Yubin, T. 2020. Co-selection for antibiotic resistance genes is induced in a soil amended with zinc. Soil Use and Management 36(2):328-337.
66. Umer, M. I. and Rajab, S. M. 2012. Correlation between aggregate stability and microbiological activity in two Russian soil types. Eurasian journal of soil science 1(1):45-50.
67. Ute, H. Holge, H. Bert, M. Kornelia, S. and Sۏren, T.B. 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. Soil Biol. Biochem 40(7):1583–1591.
68. Walkley, A. and Black, I. A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil science 37(1):29-38.
69. Wang, C. Ding, Y. Teppen, B. J. Boyd, S. A. Song, C. and Li, H. 2009. Role of interlayer hydration in lincomycin sorption by smectite clays. Environmental science & technology 43(16):6171-6176.
70. Xu, Y. Yu, W. Ma, Q. and Zhou, H. 2013. Accumulation of copper and zinc in soil and plant within ten-year application of different pig manure rates. Plant, soil and environment 59(11):492-499.
71. Xu, Y. Yu, W. Ma, Q. and Zhou, H. 2015. Occurrence of (fluoro) quinolones and (fluoro) quinolone resistance in soil receiving swine manure for 11 years. Science of the Total Environment 530:191-197.
72. Xu, Y. Yu, W. Ma, Q. Wang, J. Zhou, H. and Jiang, C. 2016. The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure. Ecotoxicology and environmental safety 134:43-52.

73. Zhang, Q. Q. Ying, G. G. Pan, C. G. Liu, Y. S. and Zhao, J. L. 2015. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. Environmental science & technology 49(11):6772-6782.
74. Zhang, X. Zhang, X. Li, L. Fu, G. Liu, X. Xing, S. ... and Chen, B. 2022. The toxicity of hexavalent chromium to soil microbial processes concerning soil properties and aging time. Environmental Research 204:111941.
75. Zhao, Y. Cocerva, T. Cox, S. Tardif, S. Su, J. Q. Zhu, Y. G. and Brandt, K. K. 2019. Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. Science of the Total Environment 656:512-520.
76. Zielezny, Y. Groeneweg, J. Vereecken, H. and Tappe, W. 2006. Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. Soil Biology and Biochemistry 38(8):2372-2380.

The consequence of Amoxicillin, Cefixime, and metronidazole application on abundance and metabolism of bacteria in uncontaminated and heavy metal-contaminated soils

Z. Najafzadeh Nobar[1], and A. A. Safari sinegani
Ph.D. student. College of Agriculture, Bu-Ali Sina University. Hamadan;
E-mail: z_najafzadeh2002@yahoo.com
Professor. Soil Science College of Agriculture, Bu-Ali Sina University. Hamadan;
E-mail: aa-safari@basu.ac.ir
Received: March, 2022 & Accepted: November, 2022

Abstract

This study aimed to investigate the effect of Amoxicillin, Cefixime, and Metronidazole on some biological properties such as basal respiration, substrate-induced respiration, and bacterial abundance in uncontaminated and heavy metal-contaminated soils. The experiment has performed with a completely randomized factorial design with three replications. Factors include three soil types (heavy metal contaminated mine soil, rangeland soil near mine, and agricultural soil), seven antibiotic treatments (control, Amoxicillin, Cefixime, and Metronidazole, each one 100 and 200 mg per kg of dry soil) and three incubation times: short-time (zero-7 days), medium-time (15 and 30 days) and long-time (60 and 90 days)). The results showed that in the medium time, the application of 200 $mg.kg^{-1}$ of antibiotics amoxicillin in agricultural soil and metronidazole in mine soil, resulted in the highest (8.4958) and lowest (4.4594) logarithm of the abundance of all soil bacteria. Rangeland soil had the highest basal respiration amount (0.1066 mg CO_2. g^{-1}dry soil. day^{-1}) in short-time incubation, and agricultural soil had the lowest basal respiration amount in both long-time (0.0144) and medium-time (0.0172). The use of 100 mg of metronidazole per kg of rangeland soil in the short time resulted in the highest amount of substrate-induced respiration (0.0251 mg CO_2. g^{-1} dry soil. h^{-1}) and the use of 100 mg of amoxicillin per kg of agricultural soil in the medium incubation time resulted in the lowest substrate-induced respiration (0.0027). It seems that agricultural soil showed the highest abundance of bacteria and mine soil showed the highest amount of substrate-induced respiration. Rangeland soil had the highest amount of basal respiration and there was no significant difference with agricultural soil in the abundance of bacteria and mine soil in the amount of substrate induced respiration. Mine soil showed the lowest abundance of bacteria and agricultural soil showed the lowest amount of basal and substrate induced respiration. The application of metronidazole resulted in the highest amount of basal and substrate induced respiration, and the lowest abundance of bacteria. The application of amoxicillin and Cefixime showed the highest abundance of bacteria and the lowest amount of substrate induced respiration, respectively. Incubation in a short time had the highest amount of basal and substrate induced respiration. The highest abundance of bacteria and the lowest amount of substrate induced respiration were observed in the medium time. The long-time incubation showed the lowest abundance of bacteria and the lowest basal respiration amount.

Keywords: Antibiotic, Bacterial Abundance, Basal and Substrate Induced Respiration

[1.] Corresponding author: Soil Science College of Agriculture Bu-Ali University, Hamadan Iran