تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین (OTC) و سولفامتاکسازول (SMX) بر نیتریفیکاسیون بالقوه و فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز در یک خاک آهکی

علی مولائی[۱]، امیر لکزیان[۲*]، غلامحسین حق‌نیا[۳]، علیرضا آستارائی[۴]، میرحسن رسولی صدقیانی[۵]، ماریا ترئزا چکرینی[۶]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۰۹)

چکیده

سالیانه مقادیر زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های داروئی اکسی‌تتراسایکلین (OTC) و سولفامتوکسازول (SMX) برای درمان بیماری‌های عفونی و بهبود رشد دام و پرندگان در سراسر دنیا به‌کار می‌رود. بیش از ۹۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌های به‌کاررفته ممکن است به‌صورت ترکیب‌های اصلی یا به‌صورت متابولیت‌های کارا از سیستم بدن دام دفع شده و وارد محیط خاک شود که ممکن است اثرات نامطلوبی بر ریزجانداران غیرهدف اعمال کند. اثرات این آنتی‌بیوتیک‌ها بر عملکرد جامعه میکروبی خاک هنوز به‌خوبی شناخته‌نشده است. در این پژوهش، برای بررسی تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول و اکسی‌تتراسایکلین بر عملکردهای میکروبی خاک، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با فاکتورهای غلظت آنتی‌بیوتیک (۰، ۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، زمان انکوباسیون (۱، ۴ و ۲۱ روز) و نوع آنتی‌بیوتیک در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. عملکرد جامعه میکروبی خاک با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی خاک و نیتریفیکاسیون بالقوه ارزیابی شد. نتایج اندازه‌گیری‌ها نشان داد که آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین، فعالیت فسفاتاز قلیائی و اوره‌آز را در روز نخست انکوباسیون به‌شدت تحت تأثیر قرارداد ولی با افزایش زمان انکوباسیون فعالیت این آنزیم‌ها بازیابی شد. درحالی‌که آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز را در مقایسه با تیمار شاهد در دوره انکوباسیون جلوگیری کرد. تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول بر میزان نیتریفیکاسیون بالقوه خاک از الگوی یکسانی پیروی کرد به‌گونه‌ای که میزان نیتریفیکاسیون در روزهای نخست انکوباسیون با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک افزایش یافت ولی باگذشت زمان، این آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات نامطلوب بر نیتریفیکاسیون بالقوه داشتند. درمجموع، آنتی‌بیوتیک OTC تأثیر نامطلوبی بر عملکردهای میکروبی خاک در روزهای نخست انکوباسیون داشت، درحالی‌که آنتی‌بیوتیک SMX اثرات پایدار بر عملکردهای میکروبی خاک اعمال کرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بیوتیک‌های داروئی، عملکردهای میکروبی خاک، فعالیت‌های آنزیمی

۱-دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲-استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد (مکاتبه کننده)
۳-استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴-دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۵-استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۶-دانشیار گروه مواد غذائی و علوم محیط‌زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فلورانس ایتالیا
*پست الکترونیک: lakzian@um.ac.ir

مقدمه

استفاده گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت دام‌پروری مدرن از سال ۱۹۶۰ یک عمل رایج برای درمان بیماری‌های عفونی و یا برای بهبود رشد دام و پرندگان در سراسر دنیا می‌باشد (Ji *et al*., 2009). بیش از ۹۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌های به کاربرد شده ممکن است به‌صورت ترکیب‌های اصلی یا به‌صورت متابولیت‌های کارا از راه فضولات یا پیشاب حیوانی دفع شوند (Nelson *et al*., 2011). بنابراین، بخش بزرگی از آنتی‌بیوتیک‌ها از راه کودهای دامی دارای آنتی‌بیوتیک که به‌عنوان عوامل حاصلخیز کننده در خاک‌های کشاورزی مورداستفاده قرار می‌گیرند وارد محیط‌زیست می‌شوند.

غلظت باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک‌ها بسته به نوع آنتی‌بیوتیک، مقدار کاربرد آن و روش‌های استخراج، در محدوده کمتر از یک میکروگرم تا ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک (Hamscher *et al*., 2002) و در کودهای دامی، از مقادیر خیلی کم تا بیش از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (Kumar *et al*., 2004) در منابع علمی گزارش‌شده است. بااین‌حال، غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک‌های کشاورزی و کودهای دامی در کشور ایران تابه‌حال اندازه‌گیری نشده است.

در خاک‌ها، بقایای آنتی‌بیوتیکی دچار تغییرات فیزیکی، شیمیایی یا بیولوژیکی بسیار زیادی می‌شوند به‌گونه‌ای که این ترکیب‌ها برحسب عواملی مانند جذب بر ذرات خاک، ترسیب و پایداری ذاتی در برابر تجزیه زیستی دارای نیم‌عمر از بین رفتن[1] (DT_{50}) بسیار متغیر می‌باشند. برای مثال، نیم‌عمر متوسط از بین رفتن سولفونامیدها[2] (SAs) ۲ تا ۱۰ روز برای بخش به سهولت قابل‌استخراج و ۳۳۰ روز برای بخش باقی‌مانده می‌باشد (Rosendahl *et al*., 2011) و نیم‌عمر از بین رفتن تتراسایکلین‌ها[3] (TCs) نیز در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای به مدت کمتر از یک هفته (Aga *et al*., 2003) تا چند ماه در خاک‌ها (Hamscher *et al*., 2002) گزارش‌شده است. بنابراین، باوجوداینکه بخش قابل‌دسترس زیستی آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است در روزهای اولیه آلودگی از بین برود ولی بخش باقی‌مانده این ترکیب‌ها هنوز می‌توانند به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی بر جوامع میکروبی غیرهدف خاک و به نوبه خود بر سلامت خاک پیامدهای منفی بگذارند (Martinez, 2009).

تأثیر نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌های داروئی بر رشد گیاه (Kong *et al*., 2007)، ریزجانداران بومی خاک (Kong *et al*., 2006)، فعالیت‌های متابولیکی و آنزیمی خاک (Ding & He, 2010) و توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان جوامع باکتریایی (Wu *et al*., 2010) گزارش‌شده است. بنابراین آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است عملکردهای زیست‌بوم و قابلیت تولید و عملکرد خاک را تحت تأثیر قرار داده و یا حتی آن‌ها را از بین ببرد و خطرات انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به بدن انسان را از راه زنجیره غذایی افزایش دهند.

تتراسایکلین‌ها (TCs) و سولفونامیدها (SAs) پرمصرف‌ترین داروهای دامپزشکی در تولیدات دامی بوده و علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت کارا می‌باشند. تتراسایکلین‌ها سنتز پروتئین باکتریایی را از راه پیوند به ریبوزوم 30S جلوگیری می‌کنند (Hackbarth & Chambers, 1989) و سولفونامیدها نیز تشکیل اسید دی‌هیدروفولیک که یک ترکیب موردنیاز برای بقاء باکتری‌ها می‌باشد را جلوگیری می‌کنند (Drillia, *et al*., 2005). بقایای این آنتی‌بیوتیک‌ها که به طور فراوان در کودهای دامی و در خاک‌ها (Hamscher *et al*., 2002) یافت می‌شوند خطرات زیست محیطی و اکولوژیکی بالقوه بر ریزجانداران خاک اعمال می‌کند.

ریزجانداران خاک که شاخص‌های اصلی سلامت خاک می‌باشند نقش محوری در بسیاری از فرآیندهای زیست‌بوم مانند چرخه‌های بیوژئوشیمیایی عناصر غذایی، ساختار خاک، ویژگی‌های هیدرولوژی و جریان انرژی ایفا می‌کنند (Schloter & Dilly, 2003). بنابراین ویژگی‌های میکروبی مانند تنوع و فعالیت‌های جوامع میکروبی خاک می‌توانند شاخص‌های سودمندی برای ارزیابی اثرات آلاینده‌ها بر سلامت خاک باشند (Mijangos *et al*., 2009). تاکنون سنجش‌های زیستی گوناگون برای تعیین اثرات انواع گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های داروئی بر ریزجانداران خاک استفاده شده است (Qasemian *et al*., 2012). در میان شاخص‌های میکروبی، فعالیت‌های آنزیمی خاک یک شاخص بالقوه برای آنالیز تنوع عملکردی جوامع میکروبی خاک می‌باشد زیرا فعالیت‌های آنزیمی ارتباط نزدیکی با

1 - Dissipation time
2 - Sulfonamides
3 - Tetracyclines

زیست‌شناسی خاک دارند (Yao *et al*. 2006). علاوه براین، اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی خاک یک روش مستقل از کشت بوده و به‌خوبی می‌تواند عملکرد واقعی همه جوامع میکروبی خاک را منعکس کند. شاخص زیستی دیگر برای ارزیابی اثرات آلاینده‌ها بر جوامع میکروبی، نیتریفیکاسیون بالقوه خاک می‌باشد که یک فرآیند بیولوژیکی مهم بوده و تعادل دینامیکی را بین ترکیب‌های ضروری آمونیاک، نیتریت‌ها و نیترات‌ها کنترل و تثبیت می‌کند. درمجموع، نیتریفیکاتورها که باکتری‌های شیمیولیتوتروف اختصاصی اکسیدکننده آمونیاک هستند و در معدنی‌شدن ازت آلی دخالت دارند در مقابل اثرات نامطلوب آلاینده‌ها حساس‌تر از بخش هتروتروفی جوامع میکروبی در سیستم خاک می‌باشند (Katipoglu-Yazan *et al*., 2016). بنابراین ترکیب روش‌های اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی و نیتریفیکاسیون بالقوه خاک که منعکس‌کننده تغییرات ناشی از آلاینده‌ها در فعالیت‌های میکروبی کل و فعالیت‌های اختصاصی باکتری‌ها می‌باشند می‌تواند برای ارزیابی اثرات آنتی‌بیوتیک‌های داروئی بر عملکردهای میکروبی خاک سودمند باشد.

در این پژوهش، اثرات آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین[1] (OTC) از خانواده تتراسایکلین‌ها و سولفامتوکسازول[2] (SMX) از خانواده سولفونامیدها که دارای کاربرد گسترده‌تر در صنعت دام‌پروری هستند بر عملکردهای کلی (فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی) و اختصاصی باکتری‌ها (نیتریفیکاسیون بالقوه) ارزیابی شد. نهایتاً اهداف این پژوهش (۱) تعیین اثرات وابسته به غلظت و زمان آنتی‌بیوتیک‌های OTC و SMX بر فعالیت‌های آنزیمی و نیتریفیکاسیون خاک و (۲) ارزیابی نوع اثرات آنتی‌بیوتیک‌های OTC و SMX با کلاس‌های ساختاری گوناگون بر این عملکردهای میکروبی خاک بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک

نمونه‌های خاک از نقاط گوناگون یک مزرعه کشاورزی واقع در حومه شهرستان ارومیه و از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری سطح خاک به‌طور تصادفی نمونه‌برداری گردید. سابقه کوددهی مزرعه به‌گونه‌ای بود که در طول یک دهه گذشته هیچ نوع کود دامی و یا کودهای آلی دیگر به‌عنوان بهساز و حاصلخیزکننده‌های خاک در مزرعه استفاده‌نشده بود. بنابراین، به‌احتمال‌زیاد بقایای آنتی‌بیوتیک‌های دارویی در مقادیر غیرقابل‌اندازه‌گیری بود. پس از برداشت بقایای گیاهی و جانوری، نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده مخلوط گردید و با الک ۲ میلی‌متری غربال شدند. بخشی از نمونه‌های خاک تا زمان آنالیزهای میکروبی در دمای ۴ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. بخش دیگری از نمونه‌های خاک هواخشک شده و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن‌ها اندازه‌گیری شد (جدول ۱). بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1962)، رطوبت ظرفیت مزرعه با صفحه فشاری (Black *et al*., 1965)، pH در عصاره اشباع (Haluschak, 2006) و درصد ماده آلی به روش والکلی و بلک (Walkley & Black, 1934) اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

Table 1- Physical and chemical characteristics of studied soil

Characteristic	Value
Sand	52.35%
Silt	29.23%
Clay	18.42%
Textural class	(Sandy loam)
pH	7.56
Organic material	0.95%
Water holding capacity	20%

مواد شیمیایی

آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول (درجه خلوص ۱۰۰٪، CAS 723-46-6، ایتالیا) و اکسی‌تتراسایکلین (درجه خلوص بیش از ۹۵٪، CAS 2058-46-0، چین) از شرکت سیگما آلدریچ[3] خریداری شدند. نمک‌ها و دیگر مواد شیمیایی به‌کار رفته در آنالیزهای میکروبی نیز دارای درجه خلوص زیاد و از شرکت مرک[4] خریداری شدند.

آماده‌سازی تیمارهای آنتی‌بیوتیک‌ها

برای پخش یکنواخت آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های خاک، ابتدا آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول و اکسی‌تتراسایکلین در شش سطح آلودگی صفر (شاهد)، یک (غلظت معمولی)، ۱۰ و ۲۵ (غلظت زیاد) و ۵۰ و ۱۰۰

1 - Oxytetracycline
2 - Sulfamethoxazole
3 - Sigma Alderich
4 - Merck

(غلظت خیلی زیاد) میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک (بر طبق غلظت‌های پیشنهادشده در گزارش‌های علمی) (Liu *et al.*, 2012) همراه با ۲ گرم بستره گلوکز بر کیلوگرم خاک (برای فعال‌سازی رشد میکروبی خاک) با ۱۰ گرم خاک سوخته (۶۰۰ درجه سلسیوس، ۴۸ ساعت) مخلوط شدند. سپس، ۱۰ گرم خاک آغشته شده با آنتی‌بیوتیک‌ها، به نمونه‌های ۲۰۰ گرمی بر پایه وزن خاک خشک افزوده شدند و به ظروف پلاستیکی ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل شدند. ظرف‌ها با درب‌های سوراخ‌دار برای تبادل اکسیژن و کاهش تبخیر آب پوشانده شدند و سپس در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۵۰ درصد ظرفیت زراعی در تاریکی انکوباسیون شدند (Zielezny *et al.*, 2006). نمونه‌برداری خاک در روزهای ۱، ۴ و ۲۱ روز انکوباسیون برای آنالیز پارامترهای میکروبی انجام شد. لازم به ذکر است که برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی خاک از غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک بر کیلوگرم خاک و برای اندازه‌گیری میزان نیتریفیکاسیون بالقوه خاک از غلظت‌های ۰، ۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک بر کیلوگرم خاک در دو آزمایش جداگانه استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی خاک

برای سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک، نمونه‌های خاک با بستره محلول پارانیتروفنیل[1] انکوباسیون شدند و پارانیتروفنل[2] آزادشده توسط فعالیت فسفاتازی خاک با روش رنگ‌سنجی در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Rodríguez-Loinaz *et al.*, 2008). برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آزی خاک نیز نمونه‌های خاک با بستره محلول اوره انکوباسیون شدند و ازت آمونیومی حاصل از تجزیه اوره توسط فعالیت اوره‌آزی خاک به روش تقطیر بخار[3] اندازه‌گیری شد (Tabatabai, 1994).

نیتریفیکاسیون بالقوه

برای اندازه‌گیری نیتریفیکاسیون بالقوه خاک، نمونه‌های خاک با محلول بستره سولفات آمونیوم و محلول کلرات سدیم مخلوط و تکان داده شدند. نیتروژن نیتریتی حاصل از عملکرد باکتری‌های نیتریفیکاتوری خاک، با محلول کلرید پتاسیم استخراج شد. عصاره‌های به‌دست‌آمده، با بافر کلرید آمونیوم و معرف رنگی سولفونیل آمید – ان-(۱-نفتیل) اتیلن دی‌آمین دی‌هیدروکلراید[4] تیمار شدند و مقدار جذب نور در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Berg & Rosswall, 1985).

طرح آماری

آنالیزهای آماری به کمک نرم‌افزار SAS 9.2 انجام گرفت. داده‌های آزمایش‌های میکروبی به کمک جدول تجزیه واریانس (ANOVA) یک‌طرفه با فاکتورهای غلظت آنتی‌بیوتیک، زمان انکوباسیون و نوع آنتی‌بیوتیک بر پایه طرح آزمایشی کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفتند. توزیع نرمال داده‌ها با آزمون کولموگورف- اسمیرنوف[5] ارزیابی شد و مقایسه میانگین‌ها برای داده‌های به‌دست‌آمده، با استفاده از آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار[6] (LSD) انجام‌گرفته و میزان اختلاف معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد در نظر گرفته شد. مقادیر داده‌ها در شکل‌ها و جداول مطابق با میانگین سه تکرار (و ± انحراف استاندارد) بودند.

نتایج و بحث

تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های OTC و SMX بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک

فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی که شاخص بسیار مهمی برای ارزیابی مسیر تغییر شکل زیستی فسفر توسط باکتری‌ها و قارچ‌های خاک می‌باشد، در نمونه‌های خاک تیمار شده با آنتی‌بیوتیک‌های OTC و SMX در طول انکوباسیون خاک اندازه‌گیری شد (شکل ۱). بر پایه جدول تجزیه واریانس داده‌ها، آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول اثرات معنی‌داری بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک داشتند. همچنین، اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک بین تیمارهای گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول وجود داشت (جدول ۲).

1- 4-nitro-phenyl phosphate disodium salt
2- *p*-nitrophenol
3- Steam distillation
4- Sulfonyl amide- N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride
5 - Kolmogorov -Smirnov
6- Least Significance Difference

جدول ۲- تجزیه واریانس غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول و برهم‌کنش آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز خاک در دوره انکوباسیون

Table 2. Analysis of variance for different concentrations of oxytetracycline and sulfamethoxazole and their interactions on alkaline phosphatase and urease activities during the incubation

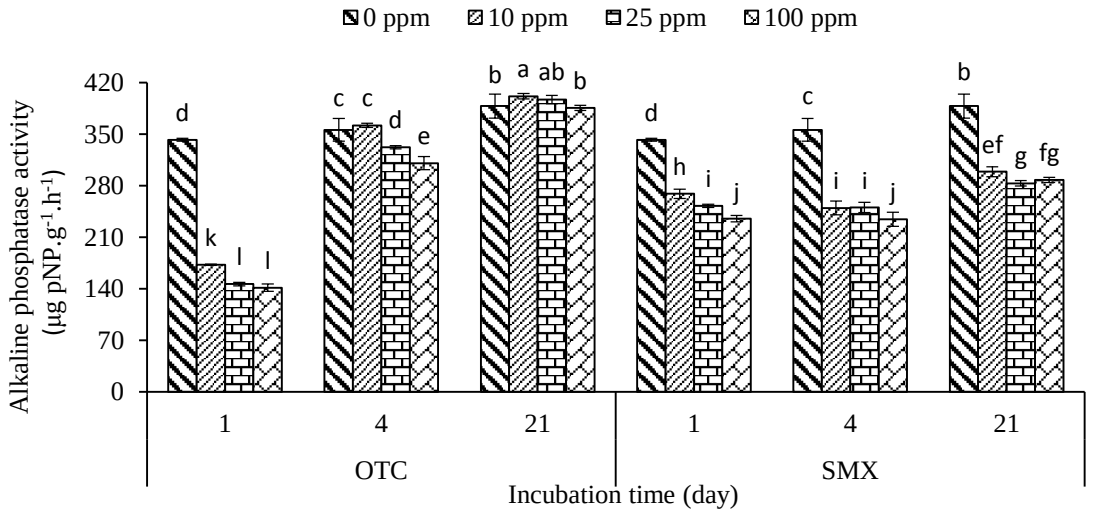
		Mean Square	
Source of variation	Degree of freedom	Alkaline phosphatase	Urease
(T)	2	81637.6**	12426.9**
(A)	1	10326.5**	0.4216ns
(C)	3	33613.5**	530.43**
(T×A)	2	43440.5**	178**
(T×C)	6	3798.32**	19.83**
(A×C)	3	1281.61**	5.65ns
(T×A×C)	6	5002.94**	40.73**
(E)	48	65.29	2.52
C.V	-	2.7	3.81

ns، ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

زمان (T)، آنتی‌بیوتیک (A)، غلظت (C)

ns: not significant, **p < 0.01

میزان فعالیت فسفاتاز قلیایی در تیمارهای گوناگون OTC و SMX در محدوده ۱۴۱/۳۷ تا ۴۰۱/۴ میکروگرم پارانیتروفنل در گرم ماده خشک در یک ساعت بود (شکل ۱). این میزان در تیمارهای OTC به‌شدت وابسته به غلظت آنتی‌بیوتیک و زمان انکوباسیون بود به‌گونه‌ای که کمترین مقدار فعالیت فسفاتازی در روز یک انکوباسیون در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و بیشترین مقدار آن در روز ۲۱ انکوباسیون و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. درحالی‌که در نمونه‌های خاک‌آلوده شده به SMX، میزان تغییرات در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک به غلظت آنتی‌بیوتیک بستگی بیشتری داشت و کمترین مقدار در روز ۴ انکوباسیون در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و بیشترین مقدار فعالیت فسفاتازی خاک در تیمار شاهد بود.



شکل ۱- تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین (OTC) و سولفامتوکسازول (SMX) در دوره انکوباسیون خاک

Figure 1. The changes of alkaline phosphatase activity at different concentrations of oxytetracycline and sulfamethoxazole during the incubation

پس از یک روز انکوباسیون، فعالیت فسفاتاز قلیایی خاک با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک OTC به‌شدت کاهش یافت ($p\leq0.05$) به‌گونه‌ای که میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک در مقایسه با تیمار شاهد نزدیک ۵۸ درصد کاهش یافت که نشان‌دهنده تأثیر شدید آنتی‌بیوتیک OTC در روز یک آلودگی بر فعالیت فسفاتاز قلیایی خاک می‌باشد (شکل ۱). این نتایج در راستای یافته‌های یانگ و همکاران (Yang *et al*., 2009b) بود که در آن فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در یک خاک با pH ۷/۸، توسط آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین به‌شدت تحت تأثیر قرار گرفت به‌گونه‌ای که فعالیت فسفاتازی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم OTC بر کیلوگرم خاک به میزان ۴۰ درصد و در غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک به میزان ۶۴ تا ۸۰ درصد کاهش یافت و این جلوگیری تا روز ۲۰ انکوباسیون ادامه داشت. بااین‌حال، با افزایش زمان انکوباسیون، فعالیت فسفاتاز قلیایی در همه تیمارهای OTC نسبت به‌روز یک انکوباسیون به‌طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) افزایش یافت ولی میزان فعالیت این آنزیم در غلظت‌های زیاد ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک نسبت به غلظت‌های پایین همچنان در مقادیر کمتری بود. یک فاکتور مهم در سرعت از بین رفتن آنتی‌بیوتیک‌ها، غلظت اولیه آن‌ها می‌باشد به‌گونه‌ای که در غلظت‌های پایین، سرعت از بین رفتن آنتی‌بیوتیک‌ها زیاد می‌باشد (Liu *et al*., 2015) درنتیجه عدم تفاوت معنی‌داری فعالیت فسفاتازی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم OTC بر کیلوگرم با تیمار شاهد در روز ۴ انکوباسیون ممکن است به این دلیل باشد. این نتیجه برای آنتی‌بیوتیک‌های دیگر مانند سولفاپیریدین (SPY) و تتراسایکلین (TC) نیز گزارش‌شده است (Thiele-Bruhn & Beck, 2005; Hammesfahr *et al*., 2008). از سوی دیگر، میزان اختلاف در فعالیت فسفاتازی در بین همه تیمارهای OTC در روزهای ۴ و ۲۱ انکوباسیون نسبت به‌روز یک انکوباسیون کمتر بود. پتانسیل بالای آنتی‌بیوتیک‌های خانواده تتراسایکلین برای جذب سریع به ماتریکس خاک ثابت‌شده است. لیو و همکاران (Liu *et al*., 2015) دریافتند که غلظت قابل‌استخراج آنتی‌بیوتیک کلرتتراسایکلین (CTC) پس از افزوده شدن به خاک به‌سرعت کاهش یافت. بنابراین جذب سریع و قوی آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین به ذرات خاک ممکن است باعث کاهش غلظت این آنتی‌بیوتیک در خاک گردیده و به‌تبع آن باعث کاهش اثر آن بر عملکردهای میکروبی خاک مانند فعالیت آنزیم فسفاتازی می‌شود. علاوه بر این، تجزیه میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها نیز نقش مهمی در کاهش بخش قابل‌دسترس زیستی این ترکیب‌ها در خاک دارد (Liu *et al*., 2015). در حقیقت، اکسی‌تتراسایکلین به‌عنوان منبع کربن برای ریزجانداران خاک عمل کرده و درنتیجه علاوه برافزایش فعالیت میکروبی در روزهای ۴ و ۲۱ انکوباسیون، باعث تجزیه این ترکیب‌ها در نمونه‌های خاک و به‌تبع آن باعث افزایش فعالیت آنزیم فسفاتازی گردید.

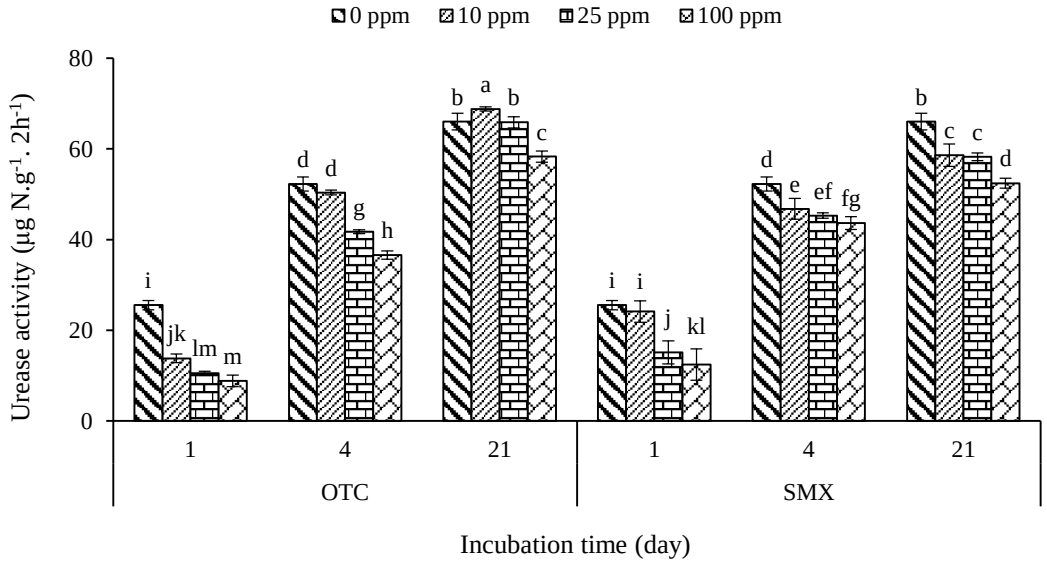
آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول (SMX) همانند آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین (OTC) اثر بازدارنده چشمگیری بر فعالیت فسفاتاز قلیایی در نمونه‌های خاک تیمار شده با این آنتی‌بیوتیک در روز یک انکوباسیون داشت (شکل ۱). اما میزان این اثرات نامطلوب در تیمارهای گوناگون آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول نسبت به تیمارهای اکسی‌تتراسایکلین در مقادیری کمتری بود که نشان‌دهنده سمیت زیاد آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بر فعالیت آنزیم فسفاتازی خاک در غلظت‌های اولیه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. بااین‌حال، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک در دوره انکوباسیون (۲۱ روز) در همه غلظت‌های آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) در مقادیر کمتری بود که نشان‌دهنده اثرات پایدار این آنتی‌بیوتیک بر فعالیت فسفاتاز قلیایی خاک می‌باشد. ضرایب جذب آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدها به دلیل ویژگی‌های آمفوتری این ترکیب‌ها در محدوده pH ۴ تا ۸ به‌شدت وابسته به pH خاک می‌باشد. در pH های اسیدی، این ترکیب‌ها دارای بار خنثی یا مثبت می‌باشند درحالی‌که در pH های خنثی و بالاتر دارای بار منفی بوده و به شکل آنیون می‌باشند. از سوی دیگر، با افزایش pH در خاک‌های آهکی، تعداد بارهای منفی افزایش‌یافته و درنتیجه آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامید ضرایب جذب کمتری در pHهای قلیایی داشته و کمتر جذب ذرات خاک می‌شوند و باعث اثرات نامطلوب بر فعالیت‌های عملکردی مانند فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک می‌شوند (Park & Huwe, 2016). عامل مهم دیگر که باعث تداوم اثرات نامطلوب سولفامتوکسازول در دوره انکوباسیون خاک شد

به دلیل پایداری زیاد این آنتی‌بیوتیک در برابر تجزیه زیستی است (Drillia *et al*., 2005) به‌گونه‌ای که الاحمد و همکاران (Al-Ahmad *et al*., 1999) قابلیت تجزیه زیستی ضعیف را برای SMX در طول ۲۸ روز انکوباسیون گزارش کردند. پژوهش‌های گوناگون نشان داده‌اند که تجزیه آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدها در خاک‌ها و در مرز آب-خاک ناچیز است (Wang *et al*., 2006; Yang *et al*., 2009a). تجزیه ضعیف سولفونامیدها را می‌توان به جلوگیری از فعالیت ریزجانداران توسط غلظت اولیه زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت داد (Zhang *et al*., 2013). یک عامل مهم دیگر در تجزیه آنتی‌بیوتیک‌های سولفونامیدها، تجزیه نوری این ترکیب‌ها می‌باشد (Baran *et al*., 2009). با توجه به اینکه در این پژوهش نمونه‌های خاک در تاریکی انکوباسیون شدند بنابراین احتمال ناپدید شدن آنتی‌بیوتیک‌ها در اثر تجزیه نوری کم بوده و اثرات دیده‌شده مربوط به اثرات نامطلوب آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول می‌باشد. در مجموع، این پژوهش نشان داد که افزودن آنتی‌بیوتیک SMX به خاک در غلظت‌های بکار رفته (۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) به‌طور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) فعالیت فسفاتازی خاک را تحت تأثیر قرارداد.

تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های OTC و SMX بر فعالیت آنزیم اوره‌آزی خاک

تغییرات کلی فعالیت آنزیم اوره‌آز که ارتباط نزدیکی با چرخه ازت در خاک دارد در نمونه‌های خاک تیمار شده با غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول در دوره انکوباسیون در شکل ۲ نشان داده‌شده است. بر پایه جدول تجزیه واریانس داده‌ها، غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول و همچنین برهم‌کنش زمان، غلظت و آنتی‌بیوتیک بر فعالیت اوره‌آزی خاک اثرات معنی‌داری دارند. درحالی‌که تفاوت معنی‌داری بین آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول بر فعالیت اوره‌آزی خاک دیده نشد (جدول ۲).

فعالیت آنزیم اوره‌آز بدون در نظر گرفتن زمان انکوباسیون، در تیمارهای گوناگون هر دو آنتی‌بیوتیک نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. این نتایج در راستای نتایج لیو و همکاران (Liu *et al*., 2015) بود که در آن تنوع عملکردی اندازه‌گیری شده با پلیت های BIOLOG تحت تأثیر غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کلرتتراسایکلین بر کیلوگرم خاک قرار گرفت. در حقیقت آنتی‌بیوتیک‌های OTC و SMX، اثرات چشمگیری بر جوامع میکروبی خاک و در پی آن بر فعالیت آنزیم اوره‌آزی خاک دارند.



شکل ۲- تغییرات فعالیت آنزیم اوره‌آز در غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین (OTC) و سولفامتوکسازول (SMX) در دوره انکوباسیون خاک

Figure 2. The changes of urease activity at different concentrations of oxytetracycline and sulfamethoxazole during the incubation

در روز یک انکوباسیون، فعالیت آنزیم اوره‌آزی در تیمارهای ۱۰، ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم اکسی‌تتراساکلین بر کیلوگرم خاک نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۶۵٪، ۵۹٪ و ۴۶٪ کاهش یافت. روابط پاسخ-غلظت واضح بین غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین نسبت به تیمار شاهد در روز یک انکوباسیون را می‌توان به اثرات ضدمیکروبی این آنتی‌بیوتیک نسبت داد (Gutierrez *et al*., 2010). با افزایش زمان انکوباسیون به ۲۱ روز، فعالیت آنزیم اوره‌آز بازیابی شده به‌گونه‌ای که فقط در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم OTC بر کیلوگرم خاک نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری دیده شد. در این پژوهش، غلظت‌های قابل‌دسترس زیستی آنتی‌بیوتیک‌ها اندازه‌گیری نشد. بنابراین نمی‌توان انتظار داشت که قابلیت دسترسی زیستی یکسان برای همه غلظت‌های آنتی‌بیوتیک OTC دلیلی بر این نتایج باشد. بااین‌حال، قابلیت دسترسی زیستی آنتی‌بیوتیک‌ها باگذشت زمان و براثر افزایش جذب آنتی‌بیوتیک‌ها به ذرات خاک (Kahle & Stamm, 2007)، تجزیه یا غیرفعال‌سازی و یا به‌وسیله تشکیل بقایای غیرقابل استخراج کاهش می‌یابد (Heise *et al*., 2006). همان‌گونه که گوتیرز و همکاران (Gutierrez *et al*., 2010) برای آنتی‌بیوتیک سولفادیازین (SDZ) نشان دادند، انتظار بر این است که قابلیت دسترسی آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک زیاد بوده و به این خاطر باعث کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز گردیده است. این نتایج در راستای یافته‌های بولیس و همکاران (Boleas *et al*., 2005) بود که در روزهای ابتدایی انکوباسیون فعالیت‌های آنزیمی خاک توسط این آنتی‌بیوتیک جلوگیری شد و در انتهای آزمایش بازیابی شدند.

فعالیت آنزیم اوره‌آز در غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم سولفامتوکسازول بر کیلوگرم خاک نسبت به غلظت‌های شاهد و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک در روزهای ۱ و ۴ انکوباسیون به گونه چشم‌گیری ($p \leq 0.05$) کاهش یافت (شکل ۲). با افزایش زمان انکوباسیون به ۲۱ روز، فعالیت آنزیم اوره‌آز در تیمار شاهد و غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک SMX افزایش یافت اما بین غلظت‌های گوناگون این آنتی‌بیوتیک و تیمار شاهد هنوز اختلاف معنی‌داری وجود داشت که نشان‌دهنده اثر پایدار آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول بر فعالیت‌های میکروبی و به‌تبع آن بر فعالیت اوره‌آزی خاک به‌صورت دیده‌شده برای اثرات این آنتی‌بیوتیک بر فعالیت آنزیم فسفاتازی قلیایی خاک می‌باشد (شکل ۱). کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز در غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک SMX و در کل زمان‌های انکوباسیون در راستای نتایج گوتیرز و همکاران (Gutierrez *et al*., 2010) می‌باشد که در آن فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و دهیدروژناز با افزودن سولفونامیدها جلوگیری شده بودند. درواقع این نتایج، تنش اعمال‌شده توسط آلودگی با بقایای آنتی‌بیوتیک‌های دارویی سولفامتوکسازول بر جوامع میکروبی خاک را آشکار کرد (Thiele-Bruhn & Beck, 2005).

کونگ و همکاران (Kong *et al*., 2006) نشان دادند که آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین در نمونه‌های خاک افزوده‌شده با بستره‌های آلی باعث کاهش توانایی ریزجانداران برای جذب بستره در پلیت‌های بیولوگ شدند. این نتایج در راستای یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد که در آن از گلوکز به‌عنوان بستره آلی استفاده شده است زیرا آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول باعث کاهش فعالیت اوره‌آزی خاک در غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک در طول آزمایش شدند. این جلوگیری ممکن است به‌واسطه تضعیف فعالیت ریزجانداران و همچنین به‌واسطه کاهش بیوماس میکروبی خاک باشد. همچنین، کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز در غلظت‌های زیاد آنتی‌بیوتیک‌های OTC و SMX ممکن است به‌واسطه کاهش فعالیت باکتری‌های نیتریفیکاتور باشد به‌گونه‌ای که میزان نیتریفیکاسیون بالقوه نیز در این پژوهش با افزایش غلظت این دو آنتی‌بیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد در روز ۲۱ انکوباسیون به گونه چشم‌گیری کاهش یافت (جدول ۴) (Fang *et al*., 2014).

تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های OTC و SMX بر نیتریفیکاسیون بالقوه

تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های داروئی اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول بر میزان نیتریفیکاسیون بالقوه خاک که به‌عنوان یک پارامتر عملکردی بیولوژیک بسیار حساس در برابر آلودگی آنتی‌بیوتیک‌های داروئی می‌باشد در جدول ۴ نشان داده‌شده است. بر پایه جدول تجزیه واریانس داده‌ها، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول در میزان نیتریفیکاسیون بالقوه خاک دیده شد. همچنین،

برهم‌کنش بین زمان‌های انکوباسیون، نوع آنتی‌بیوتیک‌ها و غلظت‌های گوناگون آن‌ها دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳).

در تیمارهای آنتی‌بیوتیک OTC، میزان نیتریفیکاسیون بالقوه خاک با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری ($p\leq0.05$) در روز یک انکوباسیون افزایش یافت. کاهش گونه‌های حساس میکروبی و افزایش بستره برای رشد باکتری‌های نیتریفیکاتور ممکن است دلیلی بر افزایش نیتریفیکاسیون بالقوه در غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک OTC باشد. درواقع، OTC به‌عنوان یک بازدارنده باکتریایی ممکن است فرآیندهای میکروبی خاک را به‌وسیله تغییر مستقیم ساختار جامعه باکتریایی و فراوانی برخی باکتری‌های عملکردی خاک تحت تأثیر قرار دهد (Bailey *et al.*, 2003). در روز ۴ انکوباسیون، میزان نیتریفیکاسیون بالقوه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک به سطح تیمار شاهد رسید که نشان‌دهنده کاهش روند افزایشی میزان نیتریفیکاسیون بالقوه در مقایسه با روز یک انکوباسیون می‌باشد. با افزایش زمان انکوباسیون به ۲۱ روز، میزان نیتریفیکاسیون بالقوه با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک‌کاهش یافت به‌گونه‌ای که در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم OTC بر کیلوگرم خاک نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری در نیتریفیکاسیون بالقوه دیده شد. درواقع، با فرض اینکه بخشی از مقادیر OTC پس از ۲۱ روز در خاک تثبیت‌شده باشد می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است غلظت‌های باقی‌مانده این آنتی‌بیوتیک به‌قدر کافی زیاد باشد و اثراتی را بر فعالیت باکتری‌های نیتریفیکاتور اعمال کند و یا اینکه ممکن است رشد ریزجانداران تحت تأثیر غلظت‌های اولیه OTC بکار برده شده در خاک باشد. ریچیل و همکاران (Reichel *et al.*, 2013) فعالیت‌های ضدمیکروبی غلظت‌های باقی‌مانده SDZ و DIF را باوجود کاهش تدریجی این ترکیبات در طول ۶۳ روز را گزارش کردند. ازاین‌رو، باوجوداینکه غلظت‌های باقی‌مانده، دارای قابلیت دسترس زیستی کم هستند ولی به‌عنوان یک منبع آزادسازی طولانی‌مدت آنتی‌بیوتیک عمل می‌کنند.

جدول ۳- تجزیه واریانس غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول و برهم‌کنش آن‌ها بر میزان نیتریفیکاسیون بالقوه خاک در دوره انکوباسیون

Table 3. Analysis of variance for different concentrations of oxytetracycline and sulfamethoxazole and their interactions on potential nitrification during the incubation

Source of variation	Degree of freedom	Mean Square
		Potential Nitrification
(T)	2	1686.72**
(A)	1	7424.19**
(C)	5	157.84ns
(T×A)	2	1163.56**
(T×C)	10	2267.59**
(A×C)	5	882.4**
(T×A×C)	10	607.13**
(E)	72	68.8
C.V	-	7.45

ns، ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

زمان (T)، آنتی‌بیوتیک (A)، غلظت (C)

ns: not significant, **p < 0.01

جدول ۴- میزان نیتریفیکاسیون بالقوه* در غلظت‌های گوناگون آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین (OTC) و سولفامتوکسازول (SMX) در دوره انکوباسیون خاک

Table 4. Potential nitrification values* at different concentrations of oxytetracycline and sulfamethoxazole during the incubation

Antibiotic	Incubation time (day)	Concentration ($mg.kg^{-1}$)					
		0	1	10	25	50	100
OTC	1	90.54 $^{k-n}$	110.65 $^{e-i}$	105.87 $^{f-j}$	116.85 $^{d-h}$	163.11 ^{a}	154.89 ^{a}
	4	104.75 $^{h-j}$	133.79 ^{b}	161.54 ^{a}	132.12 ^{bc}	132.63 ^{bc}	108.82 $^{f-i}$
	21	128.05 $^{b-d}$	122.92 $^{b-e}$	118.28 $^{d-g}$	105.29 $^{g-j}$	77.11 ^{n}	85.19 ^{mn}
SMX	1	90.54 $^{k-n}$	99.33 $^{i-l}$	78.30 ^{n}	102.19 $^{i-k}$	105.69 $^{g-j}$	119.27 $^{c-f}$
	4	104.75 $^{h-j}$	99.22 $^{i-l}$	90.08 $^{k-n}$	111.72 $^{e-i}$	126.02 $^{b-d}$	111.24 $^{e-i}$
	21	128.05 $^{b-d}$	105.27 $^{g-j}$	94.42 $^{j-m}$	109.84 $^{e-i}$	88.62 $^{l-n}$	89.39 $^{k-n}$

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد طبق آزمون LSD می‌باشد.

* میکروگرم نیتروژن بر گرم در ۵ ساعت

* $\mu g\ N\ g^{-1}\ 5\ h^{-1}$

تأثیر آنتی‌بیوتیک SMX بر میزان نیتریفیکاسیون بالقوه در روز یک انکوباسیون مشابه اثرات آنتی‌بیوتیک OTC بر این پارامتر بیولوژیکی خاک می‌باشد با این تفاوت که میزان افزایش نیتریفیکاسیون در غلظت‌های گوناگون SMX در مقایسه با آنتی‌بیوتیک OTC کمتر می‌باشد ($p\leq0.05$) که نشان‌دهنده اثرات بهبودی کمتر آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول بر نیتریفیکاسیون بالقوه خاک می‌باشد. با افزایش زمان انکوباسیون (۲۱ روز)، نیتریفیکاسیون بالقوه به گونه چشم‌گیری تحت تأثیر غلظت‌های افزایشی آنتی‌بیوتیک SMX قرار گرفت ($p\leq0.05$). نتیجه شگفت‌انگیز این است که آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول در غلظت خیلی کم (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) باعث کاهش معنی‌دار فعالیت نیتریفیکاسیون بالقوه در مقایسه با تیمار شاهد شد. حداقل غلظت آلاینده که در آن ۵۰ درصد فعالیت میکروبی جلوگیری می‌شود (MIC_{50}) برای آنتی‌بیوتیک SMX در محدوده غلظت ۰/۰۰۲ تا ۲۵۶ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد که این غلظت به گونه‌های باکتریایی خاک بستگی دارد (Al-Ahmad *et al*., 1999) بنابراین آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول در غلظت‌های زیست محیطی می‌تواند فعالیت جامعه میکروبی خاک را تحت تأثیر قرار دهد. به سخن دیگر، این آنتی‌بیوتیک حتی در مقادیر کم می‌تواند اثرات نامطلوب بر جامعه میکروبی خاک مخصوصاً باکتری‌های نیتریفیکاتور اعمال کنند. درنتیجه، باکتری‌های نیتریفیکاتور، یک شاخص زیستی بسیار حساس برای ارزیابی اثرات آنتی‌بیوتیک‌های باکتریواستاتیک[1] بر فعالیت‌های متابولیکی خاک می‌باشند. هم‌راستا با این پژوهش، هامسفر و همکاران (Hammesfahr *et al*., 2011) در خاک‌های تیمار شده با کودهای دامی دارای آنتی‌بیوتیک سولفادیازین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، اثرات نامطلوب این ترکیب‌ها را بر نیتریفیکاسیون و معدنی شدن بالقوه مشاهده کردند. همچنین اسمیت و همکاران (Schmitt *et al*., 2005) دریافتند که باکتری‌های مرتبط با اکسیداسیون آمونیوم مانند آلفا و بتا پروتئوباکترها توسط آنتی‌بیوتیک‌های خانواده سولفونامیدها به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌گیرند.

روی همرفته، اثرات آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول بر عملکردهای میکروبی خاک ممکن است بازمان در معرض قرارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها با خاک، بستره‌های مغذی (کود دامی، لجن فاضلاب، ترشحات ریشه و گلوکز)، ویژگی‌های خاک (pH، رطوبت، مواد آلی و تهویه)، نوع پوشش گیاهی، گونه‌های آنتی‌بیوتیکی و فاکتورهای زیست محیطی (دما، رطوبت، نزولات آسمانی و اشعه‌های خورشیدی) تغییر کند (Rosendahl *et al*., 2011). پژوهش حاضر در یک نوع خاک با بستره گلوکز و دو نوع آنتی‌بیوتیک با ساختار شیمیایی گوناگون تحت شرایط کنترل‌شده انجام‌گرفته است. بنابراین هنگام استفاده از نتایج پژوهش حاضر در تحقیقات دیگر دقت کافی باید در نظر گرفته شود. همچنین، تحقیقات بیشتر برای ارزیابی اثرات آنتی‌بیوتیک‌های داروئی در غلظت‌های

1 - Bacteriostatic

مرتبط با زیست محیطی بر عملکردهای میکروبی خاک و سرنوشت و اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک‌های اصلاح‌شده با کودهای دامی دارای آنتی‌بیوتیک در خاک‌های زراعی ایران ضروری است زیرا کوددهی مکرر با کودهای دامی می‌تواند منجر به ماندگاری بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک شده و خطرات زیست محیطی و اکولوژیکی بالقوه بر کیفیت خاک و سلامت انسان اعمال کند (Heuer *et al.*, 2011).

نتیجه‌گیری کلی

اثرات سم‌شناسی اکولوژیکی نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول (SMX) و اکسی‌تتراسایکلین (OTC) که دارای ساختارهای شیمیایی گوناگون هستند، بر عملکردهای میکروبی اندازه‌گیری شده در دوره انکوباسیون دیده شد. تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های OTC و SMX بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز متفاوت بود. آنتی‌بیوتیک OTC اثرات بازدارندگی شدید بر فعالیت این آنزیم‌ها در روزهای ابتدائی انکوباسیون داشت و با افزایش زمان انکوباسیون، این آنتی‌بیوتیک فقط در غلظت‌های زیاد اثرات نامطلوب بر فعالیت‌های آنزیمی داشت. درنتیجه، آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین اثرات بازدارندگی موقتی بر فعالیت‌های آنزیمی در غلظت‌های مرتبط با زیست محیطی اعمال کرد. برعکس، آنتی‌بیوتیک SMX در دوره انکوباسیون اثرات شدیدی بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیائی و اوره‌آزی داشت که نشان‌دهنده پیامدهای نامطلوب این آنتی‌بیوتیک بر فعالیت‌های آنزیمی و به‌تبع آن بر عملکردهای میکروبی خاک می‌باشد. میزان نیتریفیکاسیون بالقوه نیز تحت تأثیر غلظت‌های افزایشی هر دو آنتی‌بیوتیک در روز انتهای انکوباسیون قرار داشت که نشان‌دهنده اثرات پایدار این آنتی‌بیوتیک‌ها بر فعالیت باکتری‌های نیتریفیکاتور خاک می‌باشد. درمجموع اثرات سمی گوناگون دیده‌شده برای آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفامتوکسازول به‌واسطه رفتار گوناگون این دو آنتی‌بیوتیک در خاک می‌باشد که شامل جذب آن‌ها بر ترکیب‌های خاک، تجزیه زیستی، کلاته‌شدن با فلزهای سنگین و جذب بر مواد آلی خاک و همچنین سمیت گوناگون این دو آنتی‌بیوتیک بر ریزجانداران خاک می‌باشد.

References

Aga D.S., Goldfish R., and Kulshrestha P. 2003. Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *Analyst*, 128: 658-662.

Al-Ahmad A., Daschner F.D., and Kümmerer K. 1999. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G and sulfamethoxazole and inhibition of wastewater bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37: 158-163.

Bailey V.L., Smith J.L., and Bolton H. 2003. Novel antibiotics as inhibitors for the selective respiratory inhibition method of measuring fungal: bacterial ratios in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 38: 154-160.

Baran W., Adamek E., Sobczak A., and Sochacka J. 2009. The comparison of photocatalytic activity of Fe-salts, TiO2 and TiO2/FeCl3 during the sulfanilamide degradation process. *Catalysis Communications*, 10: 811-814.

Berg P., and Rosswall T. 1985. Ammonium oxidizer numbers, potential and actual oxidation rates in two Swedish arable soils. *Biology and Fertility of Soils*, 1: 131-140.

Black C.A., Evans D., and Dinauer R. 1965. Methods of Soil Analysis, No 9, American Society of Agronomy Madison, WI. Pp. 961-1011.

Boleas S., Alonso C., Pro J., Fernandez C., Carbonell G., and Tarazona J.V. 2005. Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS·3) and influence of manure co-addition. *Journal of Hazardous Materials*, 122: 233-241.

Bouyoucos G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal*, 54: 464-465.

Ding C., and He J. 2010. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 925-941.

Drillia P., Dokianakis S.N., Fountoulakis M.S., Kornaros M., Stamatelatou K., and Lyberatos G. 2005. On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: the example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials*, 122: 259-265.

Fang H., Han Y., Yin Y., Pan X., and Yu Y. 2014. Variations in dissipation rate, microbial function and antibiotic resistance due to repeated introductions of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline to soil. *Chemosphere*, 96: 51-56.

Gutierrez I.R., Watanabe N., Harter T., Glaser B., and Radke M. 2010. Effect of sulfonamide antibiotics on microbial diversity and activity in a Californian Mollic Haploxeral. *Journal of Soils and Sediments*, 10: 537-544.

Hackbarth C.J., and Chambers H.F. 1989. Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 99-104.

Haluschak P. 2006. Laboratory Methods of Soil Analysis. Canada-Manitoba Soil Survey, pp. 3-133.

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: 1583-1591.

Hammesfahr U., Kotzerke A., Lamshöft M., Wilke B.M., Kandeler E., and Thiele-Bruhn S. 2011. Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on a soil microbial community. *European Journal of Soil Biology*, 47: 61-68.

Hamscher G., Sczesny S., Hoper H., Pawelzick H., and Nau H. 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74: 1509-1518.

Heise J., Hiiltge S., Schrader S., and Kreuzig R. 2006. Chemical and biological characterization of non-extractable sulfonamide residues in soil. *Chemosphere*, 65:2352-2357.

Heuer H., Schmitt H., and Smalla K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 236-243.

Ji L., Chen W., Duan L., and Zhu D. 2009. Mechanisms for strong adsorption of tetracycline to carbon nanotubes: a comparative study using activated carbon and graphite as adsorbents. *Environmental Science and Technology*, 43: 2322-2327.

Kahle M., and Stamm C. 2007. Time and pH-dependent sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to clay minerals and ferrihydrite. *Chemosphere*, 68: 1224-1231.

Katipoglu-Yazan T., Merlin C., Pons M.N., Ubay-Cokgor E., and Orhon D. 2016. Chronic impact of sulfamethoxazole on the metabolic activity and composition of enriched nitrifying microbial culture. *Water Research*, 100: 546-555.

Kong W.D., Zhu Y.G., Fu B.J., Marschner P., and He J.Z. 2006. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. *Environmental Pollution*, 143: 129-137.

Kong W.D., Zhu Y.G., Liang Y.C., Zhang J., Smith F.A., and Yang A. 2007. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa L.*). *Environmental Pollution*, 147: 187-193.

Kumar K., Thompson A., Singh A.K., Chander Y., Gupta S.C. 2004. Enzyme linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples. *Journal of Environmental Quality*, 33: 250-256.

Liu B., Li X., Zhang X., Wang J., and Gao M. 2015. Effects of chlortetracycline on soil microbial communities: Comparisons of enzyme activities to the functional diversity via Biolog EcoPlates™. *European Journal of Soil Biology*, 68: 69-76.

Liu W., Pan N., Chen W., Jiao W., and Wang M. 2012. Effect of veterinary oxytetracycline on functional diversity of soil microbial community. *Plant Soil and Environment*, 58: 295-301.

Martinez J.L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157: 2893-2902.

Mijangos I., Becerril J.E.M., Albizu I., Epelde L., and Garbisu C. 2009. Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and-independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 505-513.

Nelson K.L., Brözel V.S., Gibson S.A., Thaler R., and Sharon A. 2011. Influence of manure from pigs fed chlortetracycline as growth promotant on soil microbial community structure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 27: 659-668.

Park J.Y., and Huwe B. 2016. Effect of pH and soil structure on transport of sulfonamide antibiotics in agricultural soils. *Environmental Pollution,* 213: 561-570.

Qasemian L., Guiral D., Ziarelli F., Van Dang T.K., and Farnet A. 2012. Effects of anthracene on microbial activities and organic matter decomposition in a Pinus halepensis litter from a Mediterranean coastal area. *Soil Biology and Biochemistry,* 46: 148-154.

Reichel R., Rosendahl I., Peeters E.T.H.M., Focks A., Groeneweg J., Bierl R., Schlichting A., Amelung W., and Thiele-Bruhn S. 2013. Effects of slurry from sulfadiazine- (SDZ) and difloxacin- (DIF) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry,* 62: 82-91.

Rodríguez-Loinaz G., Onaindia M., Amezaga I., Mijangos I., and Garbisu C. 2008. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. *Soil Biology and Biochemistry,* 40: 49-60.

Rosendahl I., Siemens J., Groeneweg J., Linzbach E., Laabs V., Herrmann C,. Vereecken H., and Amelung W. 2011. Dissipation and sequestration of the veterinary antibiotic sulfadiazine and its metabolites under field conditions. *Environmental Science and Technology,* 45: 5216-5222.

Schloter M., Dilly O., and Munch J.C. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture Ecosystems and Environment,* 98: 255-262.

Schmitt H., Haapakangas H., and van Beelen P. 2005. Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. *Soil Biology and Biochemistry,* 37: 1882-1892.

Tabatabai M.A. 1994. Soil enzymes. *In*: Weaver R.W., Angle J.S., and Bottomley P.S (Ed.). Methods of soil analysis- Part 2, Microbiological and biochemical properties, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 801-834.

Thiele-Bruhn S., and Beck I.C. 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere,* 59: 457-465.

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: 29-38.

Wang Q., Guo M., and Yate S.R. 2006. Degradation kinetics of manure-derived sulfadimethoxine in amended soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 54: 157-163.

Wu N., Qiao M., Zhang, B., Cheng W.D., Zhu Y.G. 2010. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China. *Environmental Science and Technology,* 44: 6933-6939.

Yang J., Ying G., Yang L., Zhao J., Liu F., Tao R., Yu Z., and Peng P. 2009a. Degradation behavior of sulfadiazine in soils under different conditions. *Journal of Environmental Science and Health,* 44: 241-248.

Yang Q., Zhang J., Zhu K., and Zhang H. 2009b. Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. *Journal of Environmental Sciences,* 21: 954-959.

Yao X.H., Min H., Lü Z.H., and Yuan H.P. 2006. Influence of acetamiprid on soil enzymatic activities and respiration. *European Journal of Soil Biology,* 42: 1200-126.

Zhang Y., Xu J., Zhong Z., Guo C., Li L., He Y., Fan W., and Chen Y. 2013. Degradation of sulfonamides antibiotics in lake water and sediment. *Environmental Science and Pollution Research,* 20: 2372-2380.

Zielezny Y., Groeneweg J., Vereecken H., and Tappe W. 2006. Impact of sulfadiazine and chlortetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. *Soil Biology and Biochemistry,* 38: 2372-2380.

Effects of Oxytetracycline (OTC) and Sulfamethoxazole (SMX) Antibiotics on Potential Nitrification and Alkaline Phosphatase and Urease Activities in a Calcareous Soil

Ali Molaei[1], Amir Lakzian[2*], Gholamhosain Haghnia[3], Alireza Astaraei[4], MirHassan Rasouli-Sadaghiani[5], Maria Teresa Ceccherini[6]

(Received: December 2016 Accepted: May 2017)

Abstract

Pharmaceutical antibiotics such as oxytetracycline (OTC) and sulfamethoxazole (SMX) are highly consumed for the treatment of infectious diseases and to growth improvement in livestock and poultry industry every year. More than 90 percent of consumed antibiotics may be excreted from the animal's body as main compounds and bioactive metabolites, and introduced into the soil environment which may impose adverse effects on non-target microorganisms. The effects of antibiotics on soil microbial functions have not been well determined yet. In this study, in order to assess the impact of oxytetracycline and sulfamethoxazole on soil microbial functions, a factorial experiment was conducted based on completely randomized design with factors of concentrations (0, 1, 10, 25, 50 and 100 $mg.kg^{-1}$ soil), time (1, 4 and 21 days) and kind of antibiotics in the laboratory conditions. Soil microbial community functions were evaluated by measuring the activities of alkaline phosphatase and urease and potential nitrification. The results showed that oxytetracycline severely affected alkaline phosphatase and urease activities in the first day of incubation. But, the activities of these enzymes were recovered with increasing the incubation time. While, sulfamethoxazole significantly inhibited activities of alkaline phosphatase and urease enzymes compared to control treatment during the incubation. The effect of oxytetracycline and sulfamethoxazole on potential nitrification followed the same pattern so that nitrification rate increased with increasing concentrations of antibiotics in the early days of incubation, but these antibiotics had adverse effects on potential nitrification over time. Overall, OTC antibiotic exerted adverse effects on soil microbial functions in the early days of incubation, while SMX antibiotic exerted long term effects on soil microbial parameters.

Keywords: Enzyme activities, Pharmaceutical antibiotics, Soil Microbial functions

1- Ph.D Student, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2- Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3- Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
4- Associate Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
5- Professor, Department of Soil Science, Urmia University
6- Associate Professor, Department of Agrifood and Environmental Science, University of Florence, Italy
* Corresponding Author Email: lakzian@um.ac.ir