



Publisher: Soil Science Society of Iran

*Journal of Soil Biology*<https://sbj.areeo.ac.ir/>

Research article

## Comparison of Ecotoxicity of Copper Oxide and Nickel Oxide Nanoparticles on Soil Enzyme Activities in Two Different Soil Textures

Shekoofeh Rezaei<sup>1\*</sup>, Ali Khanmirzaei<sup>1</sup>, and Vahideh Sharifi Golro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Soil Science, Ka,C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Article Info	Extended Abstract
<p><b>Received:</b> 2026-01-05  <b>Accepted:</b> 2026-04-25</p> <p><b>Keywords:</b>  Metal oxide nanoparticles,  Phosphatases,  Soil pollution,  Soil texture,  Urease</p> <p><b>Corresponding author's email:</b>  <a href="mailto:Shekoofeh.rezaei@iau.ac.ir">Shekoofeh.rezaei@iau.ac.ir</a>  <a href="mailto:Rezaee_sh@yahoo.com">Rezaee_sh@yahoo.com</a></p> <p><b>Doi:</b>  10.22092/sbj.2026.371895.293</p>	<p><b>Background and Objectives:</b> In recent decades, the rapid advancement of nanotechnology has revolutionized various sectors, including agriculture, medicine, and electronics. Consequently, the release of engineered nanoparticles (ENPs) into the environment has become increasingly unavoidable. Soil serves as a primary sink for these pollutants and accumulates nanoparticles through the application of nano-fertilizers, pesticides, wastewater sludge, and atmospheric deposition. Among various nanomaterials, metal oxide nanoparticles (MO-NPs), particularly copper oxide (CuO) and nickel oxide (NiO), are widely used due to their unique catalytic and antimicrobial properties. However, their accumulation in soil ecosystems raises serious concerns regarding their potential ecotoxicity to non-target organisms. Soil health and fertility are closely linked to the activity of soil microorganisms and their extracellular enzymes. Enzymes such as urease and phosphatases play pivotal roles in the biogeochemical cycling of nitrogen (N) and phosphorus (P), respectively. Any disruption in their functionality can lead to the deterioration of soil quality and nutrient availability. The toxicity of nanoparticles in soil is a complex phenomenon governed not only by the type and concentration of the contaminant but also by the physicochemical properties of the soil, such as texture and organic matter content. While studies have assessed the toxicity of individual nanoparticles, comparative research on the time-dependent effects of CuO and NiO nanoparticles in calcareous soils with distinct textures remains limited. Therefore, this study aimed to comparatively evaluate the ecological toxicity of CuO and NiO nanoparticles on key soil biochemical indicators (urease, acid phosphatase, and alkaline phosphatase) in two soils with contrasting textural properties (Sandy Loam vs. Clay) to understand the interaction between soil matrix and nanoparticle toxicity kinetics.</p> <p><b>Materials and Methods:</b> To investigate the role of soil texture in modulating nanoparticle toxicity, two surface soil samples (0–30 cm) were collected from agricultural lands with distinct physicochemical characteristics. The first soil was characterized as Sandy Loam (Sand: 58.2%, Clay: 19.8%, Organic Carbon: 0.70%), while the second soil was classified as Clay (Sand: 18.2%, Clay: 49.8%, Organic Carbon: 1.37%). The study was conducted as a factorial experiment based on a Completely Randomized Design (CRD) with three replications under controlled laboratory conditions at 25°C. The experimental factors included Nanoparticle Type (Copper oxide ~40 nm and Nickel oxide 10–20 nm, both with 99% purity), Concentration (four levels: 0, 100, 500, and 1000 mg kg<sup>-1</sup> dry soil), and Incubation Time (three intervals: 7, 24, and 72 days) to assess toxicity kinetics. To simulate realistic exposure conditions and avoid any solvent-related interference, nanoparticles were added to the soil as dry powder (uncoated) and thoroughly mixed. Soil moisture was maintained at 60% of field capacity (FC) throughout the incubation. At each sampling time, enzyme activities were assayed using standard spectrophotometric methods: Urease activity was quantified by measuring the ammonium released during urea hydrolysis, while Acid and Alkaline Phosphatase activities were quantified by the release of p-nitrophenol (pNP) using p-nitrophenyl phosphate as the substrate. Statistical analyses, including Independent</p>

Samples t-test for baseline comparison and ANOVA followed by Duncan's multiple range test for treatment effects, were performed to interpret the data.

**Results:** Independent t-test results revealed a significant inherent difference in the biological potential of the two soils. The baseline activity of acid phosphatase in the Clay soil ( $658 \mu\text{g pNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) was approximately 66% higher than that of the Sandy Loam soil ( $396 \mu\text{g pNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) ( $P < 0.01$ ), emphasizing the role of clay and organic matter in supporting enzymatic pools. Analysis of variance revealed significant main effects and interactions (Time  $\times$  Type  $\times$  Concentration). CuO nanoparticles exerted consistently higher and more persistent toxicity than NiO across both soil types. In the Sandy Loam soil, the impact was severe due to low buffering capacity. At the highest concentration ( $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) of CuO, urease activity plummeted by over 90% relative to the control by the end of the incubation period (day 72). This inhibition is primarily attributed to the relatively high solubility of CuO and the interaction of  $\text{Cu}^{2+}$  ions with thiol (-SH) groups in enzyme active sites. Conversely, NiO nanoparticles exhibited a time-lag toxicity pattern, where significant inhibition in Sandy Loam soil was delayed until day 72. In contrast, the inhibitory effects were notably ameliorated in the Clay soil. A key finding was the non-significant main effect of incubation time on urease activity ( $P > 0.05$ ) in the clay soil. This suggests that the high clay content (49.8%) facilitated the formation of stable enzyme-clay-humus complexes, which protected urease enzyme from denaturation and proteolytic degradation over time. Interestingly, NiO nanoparticles at lower concentrations ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) occasionally demonstrated a hormetic effect (stimulation of activity), particularly for alkaline phosphatase in the early stages, contrasting with CuO which generally followed a strict dose-dependent inhibition pattern.

**Conclusion:** This study provides robust evidence that soil texture is a key determinant in the ecological risk assessment of engineered nanoparticles. Light-textured (Sandy Loam) soils exhibit significantly higher ecological sensitivity to metal oxide contamination compared to heavy-textured (Clay) soils, which possess a "protective effect" due to higher colloidal content. Among the tested pollutants, CuO nanoparticles pose a more severe and immediate threat to soil nutrient cycling than NiO due to their higher chemical reactivity. The findings suggest that environmental risk assessments for nanomaterials must account for site-specific soil properties and the dynamic nature of toxicity (aging effect) over time. Future research should focus on molecular-level mechanisms and long-term field monitoring to further validate these interactions.

---

**Cite this article:** Rezaei, Sh., Khanmirzaei, A., Sharifi Golro, V., 2026. Comparison of Ecotoxicity of Copper Oxide and Nickel Oxide Nanoparticles on Soil Enzyme Activities in Two Different Soil Textures. Research article, *Journal of Soil Biology*, 14 (1), 61-80 .



**DOI:** 10.22092/sbj.2026.371895.293

**Publisher:** Soil Science Society of Iran



## مقاله پژوهشی

## مقایسه سمیت اکولوژیک نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل بر فعالیت‌های آنزیمی در دو خاک با بافت متفاوت

شکوفه رضائی<sup>۱\*</sup>، علی خانمیرزایی<sup>۱</sup> و وحیده شریفی‌گلرو<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه خاکشناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۰۵

## چکیده

گسترش روزافزون کاربرد نانوذرات مهندسی‌شده در صنایع و کشاورزی نگرانی‌هایی را در خصوص سلامت بستر خاک ایجاد کرده است. این پژوهش با هدف ارزیابی و مقایسه سمیت اکولوژیک نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل بر شاخص‌های بیوشیمیایی در دو نوع خاک با ویژگی‌های بافتی متفاوت انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور شامل نوع نانوذره (CuO و NiO)، غلظت نانوذره (۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک خشک) و زمان انکوباسیون (۷، ۲۴ و ۷۲ روز) در دو خاک با بافت لوم شنی و رسی اجرا گردید. فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز اسیدی و فسفاتاز قلیایی به‌عنوان شاخص‌های پاسخ زیستی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که نوع بافت خاک نقش تعیین‌کننده‌ای در شدت پاسخ آنزیمی ایفا می‌کند؛ به‌طوری‌که میانگین پایه فعالیت فسفاتاز اسیدی در خاک رسی (۳۹۶ μg pNP g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) حدود ۶۶ درصد بالاتر از خاک لوم شنی (۳۹۶ μg pNP g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) بود (P < ۰.۰۱). نانوذرات اکسید مس سمیت شدیدتری نسبت به نیکل اعمال کردند؛ به‌گونه‌ای که در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم CuO، فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک لوم شنی در انتهای دوره (روز ۷۲) تا بیش از ۹۰ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. در مقابل، نانوذرات NiO در غلظت پایین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در برخی موارد موجب افزایش فعالیت آنزیمی شدند. همچنین، اثر زمان بر فعالیت اوره‌آز در خاک رسی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P > 0.05) که نشان‌دهنده پایداری آنزیمی در حضور ۴۹/۸ درصد رس است، در حالی‌که در خاک لوم شنی (با ۱۹/۸ درصد رس) فعالیت آنزیم‌ها نوسانات زمانی و کاهش معنی‌داری را تجربه کردند. به‌طور کلی، خاک‌های با بافت سبک حساسیت اکولوژیک بسیار بالاتری نسبت به آلودگی نانوذرات اکسید فلزی دارند و نانوذرات اکسید مس حتی در غلظت‌های پایین تهدیدی جدی‌تر نسبت به اکسید نیکل برای چرخه عناصر غذایی خاک محسوب می‌شوند.

**واژه‌های کلیدی:** آلودگی خاک، اوره‌آز، بافت خاک، فسفاتازها، نانوذرات اکسید فلزی.

## مقدمه

در دهه‌های اخیر، فناوری نانو به عنوان یکی از پیشران‌های کلیدی انقلاب صنعتی نوین، تحولات شگرفی در حوزه‌های مختلف از جمله پزشکی، الکترونیک، صنایع شیمیایی و کشاورزی ایجاد کرده است (Khan et al., 2023). تولید جهانی نانوذرات مهندسی شده (ENPs)<sup>۱</sup> به دلیل ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی منحصر به فرد آن‌ها، نظیر نسبت سطح به حجم بالا و واکنش‌پذیری شیمیایی زیاد، به شدت در حال افزایش است. برآورد می‌شود که بخش قابل توجهی از این نانوذرات در نهایت از طریق مسیرهای مختلفی همچون کاربرد مستقیم کودها و سموم نانوپایه، استفاده از لجن فاضلاب در اراضی کشاورزی و نه‌شست اتمسفری وارد بستر خاک می‌شوند (Rajput et al., 2021). در میان انواع نانومواد، نانوذرات اکسید فلزی<sup>۲</sup> به دلیل کاربردهای گسترده در کاتالیزورها، حسگرها و عوامل ضد میکروبی، سهم بزرگی از آلاینده‌های نوظهور خاک را به خود اختصاص داده‌اند (Yousefi et al., 2023). با توجه به اینکه خاک مخزن نهایی بسیاری از آلاینده‌های زیست‌محیطی است، نگرانی‌های فزاینده‌ای در خصوص پایداری اکوسیستم‌های خاکی و سلامت زنجیره غذایی در اثر تجمع این نانوذرات وجود دارد.

کیفیت و سلامت خاک تابعی از تعادل پیچیده بین ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی آن است (Aliasgharzad, 2026). در این میان، جوامع میکروبی خاک و فعالیت‌های آنزیمی آن‌ها نقش بنیادینی در تجزیه مواد آلی، چرخه عناصر غذایی و پایداری ساختمان خاک ایفا می‌کنند (Datta et al., 2020; Fallah Nosratabad & Khoshru, 2024). آنزیم‌های خارج سلولی خاک، به عنوان کاتالیزورهای زیستی، نسبت به تغییرات محیطی و حضور آلاینده‌ها بسیار حساس بوده و اغلب به عنوان هشدارهای زودهنگام<sup>۳</sup> برای پایش آلودگی خاک مورد استفاده قرار می‌گیرند (Alkorta et al., 2017).

در بین آنزیم‌های خاک، اوره‌آز (EC 3.5.1.5) و فسفاتازها (EC 3.1.3) از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. اوره‌آز با هیدرولیز اوره به آمونیاک و دی‌اکسید کربن، نقشی حیاتی در چرخه نیتروژن ایفا می‌کند، در حالی که فسفاتازها (اسیدی و قلیایی) مسئول معدنی کردن فسفر آلی و تأمین فسفر قابل جذب برای گیاهان و ریزجانداران هستند (Cui et al., 2022). هرگونه اختلال در فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند منجر به کاهش حاصلخیزی خاک و اختلال در عملکرد اکوسیستم‌های زراعی شود.

امروزه نانوذرات اکسید فلزی جایگاه ویژه‌ای در صنعت و کشاورزی هوشمند پیدا کرده‌اند (Khoshru et al., 2025). نانوذرات اکسید مس (CuO-NPs) به دلیل خواص ضدقارچی و ضدباکتری قوی، به عنوان نسل جدیدی از آفت‌کش‌ها و قارچ‌کش‌های نانوپایه و همچنین به عنوان نانوکود برای تأمین مس (ریزمغذی ضروری فتوسنتز) کاربرد گسترده‌ای دارند (Parween et al., 2021). نانوذرات اکسید نیکل (NiO-NPs) نیز علاوه بر کاربرد وسیع در تولید باتری‌ها و کاتالیزورهای شیمیایی، به عنوان منبع تأمین نیکل (کوفاکتور آنزیم اوره‌آز) و ساخت حسگرهای زیستی جهت پایش کیفیت خاک مورد توجه قرار گرفته‌اند (Faisal et al., 2024). با این حال، استفاده گسترده و ورود بی‌رویه این نانوذرات به خاک می‌تواند اثرات سمیت زیست‌محیطی مخربی داشته باشد. مکانیسم‌های اصلی سمیت این نانوذرات شامل تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)<sup>۴</sup>، ایجاد تنش اکسیداتیو، آسیب به غشای سلولی ریزجانداران و آزادسازی یون‌های فلزی سمی (Ni<sup>2+</sup> و Cu<sup>2+</sup>) است (Rastogi et al., 2017). مطالعات نشان داده‌اند که حساسیت ریزجانداران و آنزیم‌های خاک نسبت به نانوذرات اکسید فلزی متفاوت است و اکسید مس به دلیل انحلال‌پذیری بالاتر، اغلب سمیت حادثتری نسبت به سایر اکسیدها نشان می‌دهد (Joško et al., 2014; Wu et al., 2020). با این وجود،

<sup>۲</sup> Early warning indicators<sup>۴</sup> Reactive Oxygen Species<sup>۱</sup> Engineered Nanoparticles<sup>۲</sup> Metal Oxide NPs

و مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف نانوذرات CuO و NiO بر فعالیت آنزیم‌های کلیدی خاک (اوره‌آز، فسفاتاز اسیدی و فسفاتاز قلیایی) و (۲) بررسی نقش بافت خاک (لوم شنی در مقابل رسی) در تعدیل سمیت این نانوذرات در دوره‌های زمانی مختلف طراحی و اجرا گردید.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک

دو نمونه خاک سطحی (عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری) با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت از اراضی کشاورزی کرج با مختصات جغرافیایی ۵۰ درجه و ۵۵ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه عرض شمالی و چیتگر با مختصات جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۳ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۴۳ دقیقه عرض شمالی انتخاب و جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، در دمای محیط، هواخشک<sup>۷</sup> شدند و پس از حذف سنگریزه‌ها و بقایای گیاهی، از الک با منافذ ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها شامل بافت خاک به روش هیدرومتری (Gee and Bauder, 1986)، کربن آلی به روش اکسیداسیون مرطوب (Walkley and Black, 1934) و واکنش خاک (pH) در سوسپانسیون خاک و آب (با نسبت ۱ به ۲/۵) اندازه‌گیری شد.

بر اساس نتایج آنالیز اولیه، خاک با بافت لوم شنی (Sandy loam) دارای میزان رس پایین (۱۹/۸ درصد) و کربن آلی کم (۰/۷ درصد) بود، در حالی که خاک با بافت رسی (Clay) از میزان رس بالا (۴۹/۸ درصد) و کربن آلی نسبتاً بیشتر (۱/۳۷ درصد) برخوردار بود. انتخاب این دو خاک با ویژگی‌های متضاد، امکان ارزیابی دقیق نقش کلوئیدهای معدنی و آلی را در تعدیل سمیت نانوذرات فراهم نمود.

مطالعات مقایسه‌ای دقیقی که رفتار این دو نانوذره را به طور همزمان بررسی کند، کمتر انجام شده است.

سمیت نانوذرات در خاک تابعی ساده از غلظت آن‌ها نیست، بلکه به شدت تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک نظیر بافت (درصد رس و شن)، مقدار ماده آلی، pH و ظرفیت تبادل کاتیونی قرار دارد (Wang et al., 2022). کلوئیدهای خاک (رس و هوموس) می‌توانند از طریق جذب سطحی نانوذرات یا تشکیل کمپلکس با یون‌های آزاد شده، زیست‌فراهمی<sup>۵</sup> آن‌ها را کاهش دهند (Cornelis et al., 2014). خاک‌های با بافت سبک (شنی) به دلیل سطح ویژه کمتر و کمبود جایگاه‌های اتصال، ممکن است سمیت بالاتری را نسبت به خاک‌های سنگین (رسی) نشان دهند. درک برهمکنش بین ماتریس خاک و نانوذرات برای ارزیابی دقیق مخاطرات بوم‌شناختی آن‌ها ضروری است.

در ایران اگرچه هنوز گزارش جامع و دقیقی از پایش سطح آلودگی خاک‌های زراعی به نانوذرات مهندسی شده منتشر نشده است، اما مطالعات متعدد حاکی از تجمع نگران‌کننده فرم‌های متعارف (توده‌ای) فلزات سنگین مس و نیکل در خاک‌های پیرامون مناطق صنعتی و اراضی کشاورزی تحت کشت فشرده است. با توجه به توسعه روزافزون فناوری نانو در صنایع داخلی و پتانسیل تبدیل و تغییر شکل این آلاینده‌ها، ارزیابی پیشگیرانه سمیت اکولوژیک فرم‌های نانویی این فلزات در بوم‌سازگان‌های خاکی کشور ضرورتی اجتناب‌ناپذیر است. علیرغم مطالعات انجام شده در زمینه سمیت نانوذرات، دانش فعلی در خصوص مقایسه اثرات نانوذرات CuO و NiO در خاک‌های آهکی ایران با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت (به‌ویژه بافت و ماده آلی) محدود است. همچنین، بررسی سینتیک سمیت<sup>۶</sup> این نانوذرات و تأثیر گذشت زمان بر تغییر شدت سمیت آن‌ها نیازمند واکاوی بیشتر است. لذا، این پژوهش با هدف (۱) ارزیابی

<sup>۷</sup> Air-dried

<sup>۵</sup> Bioavailability

<sup>۶</sup> Toxicity kinetics

## مشخصات نانوذرات مهندسی شده

در این مطالعه، نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل با درجه خلوص صنعتی بالا (۹۹ درصد) از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد، ایران) تهیه گردیدند. طبق آنالیزهای فنی ارائه شده توسط شرکت سازنده، نانوذرات اکسید مس دارای مورفولوژی کروی، میانگین اندازه ذرات ۴۰ نانومتر، رنگ سیاه، چگالی توده ۰/۷۹ گرم بر سانتی متر مکعب و سطح ویژه (SSA<sup>۱</sup>) تقریبی ۲۰ مترمربع بر گرم بودند. در مقابل، نانوذرات اکسید نیکل دارای مورفولوژی شبه کروی، دامنه اندازه ذرات بین ۱۰ تا ۲۰ نانومتر، رنگ خاکستری تیره، چگالی توده ۰/۸ گرم بر سانتی متر مکعب و سطح ویژه بین ۵۰ تا ۱۰۰ مترمربع بر گرم گزارش شدند. شایان ذکر است که به منظور شبیه سازی شرایط واقعی نهشت غبارات نانو در خاک و همچنین جلوگیری از تداخلات احتمالی ناشی از افزودن حلال‌ها یا سورفکتانت‌های شیمیایی، نانوذرات در این پژوهش بدون استفاده از حلال و سط و به صورت پودر خشک توزین و مستقیماً به نمونه‌های خاک اضافه شدند. نانوذرات مورد استفاده در این پژوهش فاقد هرگونه پوشش سطحی<sup>۹</sup> یا مواد پایدارکننده پلیمری بودند تا اثرات خالص سمیت نانوذرات اکسید فلزی مورد ارزیابی قرار گیرد.

## طراحی آزمایش و اعمال تیمارها

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل سه‌عاملی در چارچوب طرح پایه کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار و در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. آزمایش در مجموع با ۱۴۴ واحد آزمایشی مستقل (۷۲ واحد برای هر نوع خاک) اجرا گردید. عامل‌های مورد آزمون عبارت بودند از: (۱) نوع نانوذره در دو سطح (اکسید نیکل و اکسید مس)، (۲) غلظت نانوذره در چهار سطح (۰ (شاهد)، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و (۳) زمان نمونه برداری (۷،

۲۴ و ۷۲ روز). آزمایش‌ها بر روی دو نوع خاک با درصد کربن آلی و بافت متفاوت انجام گرفت. در پایان آزمایش فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی و اوره‌آز به عنوان متغیرهای پاسخ اندازه‌گیری شد. برای آماده‌سازی تیمارها، ابتدا مقدار وزنی محاسبه شده از هر نانوذره (متناسب با سطوح غلظت مورد نظر) به ۱۰۰ گرم از نمونه‌های خاک خشک اضافه شد. به منظور اطمینان از توزیع یکنواخت و همگن شدن نانوذرات در بستر خاک، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از همزن مکانیکی مخلوط گردیدند. سپس رطوبت نمونه‌ها با افزودن آب مقطر به حد ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (FC<sup>۱۰</sup>) رسانده شد. نمونه‌های تیمار شده درون ظروف پلی اتیلنی درب‌دار قرار گرفته و جهت طی دوره خواب به انکوباتور تاریک با دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. طی دوره آزمایش، رطوبت خاک‌ها به صورت وزنی پایش شد و با افزودن آب مقطر در حد ثابت ۶۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری گردید. در نهایت، نمونه برداری از خاک‌ها جهت انجام سنجش‌های بیوشیمیایی در سه مقطع زمانی ۷، ۲۴ و ۷۲ روز پس از آغاز انکوباسیون صورت پذیرفت.

## سنجش فعالیت‌های آنزیمی خاک

به منظور تعیین تغییرات بیوشیمیایی خاک تحت تیمار نانوذرات، فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز (اسیدی و قلیایی) با استفاده از روش‌های استاندارد رنگ‌سنجی<sup>۱۱</sup> و دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای سنجش فعالیت آنزیم اوره‌آز، از روش توصیف شده توسط زانتوا و برمنر (Zantua and Bremner, 1977) استفاده گردید. بدین منظور، ۵ گرم از نمونه خاک مرطوب در ارلن مایر توزین شد و جهت متوقف کردن فعالیت تکثیر میکروبی حین سنجش، ۱/۵ میلی لیتر تولوئن به آن اضافه گردید. پس از گذشت ۱۰

<sup>۱۰</sup> Field Capacity<sup>۱۱</sup> Colorimetry<sup>۸</sup> Specific Surface Area<sup>۹</sup> Uncoated

واریانس<sup>۱۷</sup> جهت بررسی اثرات اصلی فاکتورها (نوع نانوذره، غلظت نانوذره و زمان) و برهمکنش‌های متقابل آن‌ها به تفکیک هر بافت خاک با استفاده از نرم‌افزار آماری Minitab انجام پذیرفت. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن<sup>۱۸</sup> در سطوح احتمال ۵ درصد ( $P < 0.05$ ) و ۱ درصد ( $P < 0.01$ ) صورت گرفت. برای مقایسه دو نوع خاک نیز از آزمون T-Test استفاده شد و در نهایت، رسم نمودارها و گراف‌های مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel انجام شد. لازم به ذکر است که به دلیل تفاوت فاحش ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی دو خاک و در نتیجه ناهمگنی واریانس خطای آزمایشی (بر اساس آزمون بارتلت)، امکان تجزیه واریانس مرکب<sup>۱۹</sup> برای دو خاک فراهم نبود؛ لذا تجزیه واریانس برای هر خاک به صورت مستقل انجام پذیرفت.

## نتایج و بحث

### ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

نتایج تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی دو خاک مورد استفاده در این پژوهش در (جدول ۱) ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، دو خاک انتخاب شده از نظر بافت و میزان ماده آلی تفاوت‌های آشکاری با یکدیگر دارند که این امر امکان بررسی دقیق‌تر نقش ویژگی‌های خاک در تعدیل سمیت نانوذرات را فراهم می‌کند.

خاک با بافت لوم شنی با دارا بودن ۵۸/۲ درصد شن و ۱۹/۸ درصد رس، در کلاس بافت سبک قرار گرفت. در مقابل، خاک با بافت رسی با محتوای رس بالا (۴۹/۸ درصد) و درصد شن پایین (۱۸/۲ درصد)، به عنوان بافت سنگین شناسایی شد. همچنین، خاک رسی با داشتن ۱/۳۷ درصد کربن آلی، از نظر محتوای کربن آلی غنی‌تر از خاک لوم شنی (۰/۷۰ درصد) بود. واکنش خاک (pH) هر

دقیقه، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول اوره به عنوان سوبسترا به خاک افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اتمام زمان واکنش، سوسپانسیون خاک با استفاده از محلول اسید استیک ۰/۰۳ مولار عصاره‌گیری و صاف شد. غلظت یون آمونیوم آزاد شده در عصاره، با افزودن معرف نسلر<sup>۱۲</sup> و در حضور تارتارات پتاسیم-سدیم تعیین گردید و جذب نوری محلول‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد. برای حذف اثر آمونیوم موجود در خاک، نمونه‌های شاهد (Control) نیز آماده شدند که در آن‌ها محلول اوره پس از پایان زمان انکوباسیون و بلافاصله قبل از عصاره‌گیری اضافه گردید.

فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی نیز بر اساس روش عیوضی و طباطبایی (Eivazi and Tabatabai, 1977) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۱ گرم خاک با ۰/۲۵ میلی‌لیتر تولوئن و ۴ میلی‌لیتر بافر اصلاح شده (MUB<sup>۱۳</sup>) مخلوط گردید. اسیدیته (pH) بافر برای سنجش فسفاتاز اسیدی روی ۶/۵ و برای فسفاتاز قلیایی روی ۱۱ تنظیم شد. واکنش آنزیمی با افزودن محلول پارا-نیتروفنیل فسفات (p-NPP<sup>۱۴</sup>) آغاز و نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت زمان واکنش، فرآیند هیدرولیز با افزودن محلول‌های کلرید کلسیم و سدیم هیدروکسید متوقف شد. میزان پارا-نیتروفنول (pNP<sup>۱۵</sup>) آزاد شده (که منجر به ایجاد رنگ زرد در محیط می‌شود) پس از صاف کردن نمونه‌ها، در طول موج ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

پیش از انجام تجزیه واریانس، فرض نرمال بودن توزیع داده‌های حاصل از سنجش‌های آنزیمی بر اساس قضیه حد مرکزی<sup>۱۶</sup> در نظر گرفته شد. سپس تجزیه

<sup>۱۶</sup> Central Limit Theorem

<sup>۱۷</sup> ANOVA

<sup>۱۸</sup> Duncan's Multiple Range Test

<sup>۱۹</sup> Combined ANOVA

<sup>۱۲</sup> Nessler

<sup>۱۳</sup> Modified Universal Buffer

<sup>۱۴</sup> para-Nitrophenyl phosphate

<sup>۱۵</sup> para-Nitrophenol

دو نمونه در محدوده خشتی تا کمی قلیایی قرار داشت و تفاوت چندانی از این نظر مشاهده نشد (۷/۶۶ در برابر ۷/۷).

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه (لوم شنی و رسی)  
Table 1. Physicochemical properties of the studied soils (Sandy Loam and Clay)

ویژگی‌ها (Properties)	خاک لوم شنی (Sandy Loam)	خاک رسی (Clay)
شن (%)	58.2	18.2
سیلت (%)	22	32
رس (%)	19.8	49.8
کربن آلی (%)	0.70	1.37
pH	7.66	7.7

در این پژوهش، به منظور بررسی دقیق‌تر اثرات نانوذرات بر بیولوژی خاک، نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای هر یک از خاک‌های لوم شنی و رسی به تفکیک ارائه شده است.

### مقایسه آماری سطح فعالیت آنزیمی بین دو نوع خاک

فسفاتاز اسیدی در خاک رسی به طور معنی‌داری بالاتر از خاک لوم شنی بود (۶۵۸ در برابر ۳۹۶). برعکس، فعالیت فسفاتاز قلیایی در خاک لوم شنی (۹۶۱) به مراتب بیشتر از خاک رسی (۶۶۳) مشاهده شد.

پیش از بررسی اثر تیمارهای نانوذرات، به منظور ارزیابی تفاوت کلی پتانسیل زیستی بین دو خاک مورد مطالعه (فارغ از نوع تیمار)، میانگین فعالیت آنزیم‌ها در دو خاک رسی و لوم شنی با استفاده از آزمون تی<sup>۲۰</sup> مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج آزمون تی (جدول ۲ و شکل ۱) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد ( $P < 0.01$ ) بین دو خاک از نظر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و فسفاتاز قلیایی وجود دارد. میانگین فعالیت

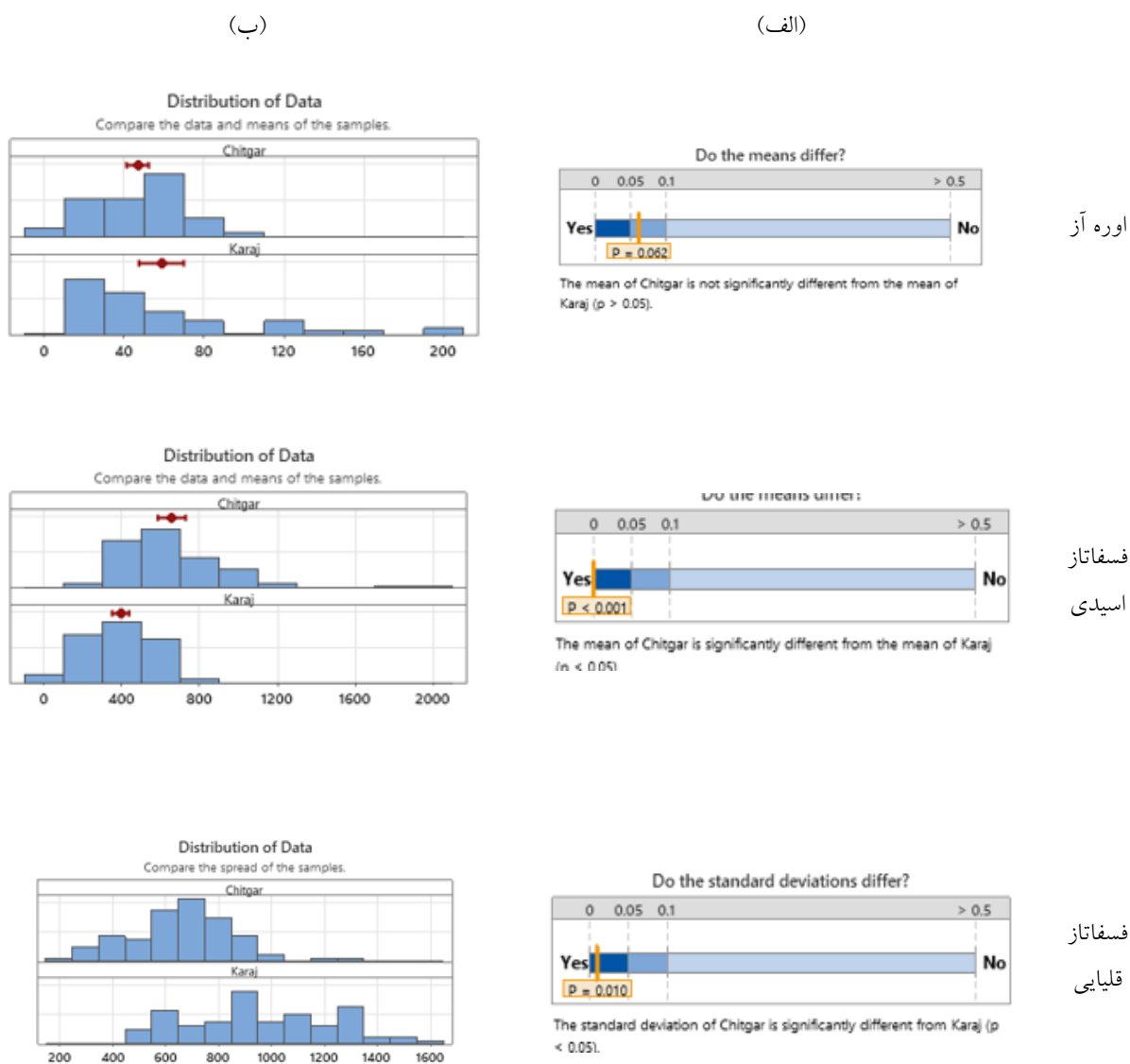
در خصوص آنزیم اوره‌آز، اگرچه میانگین فعالیت در خاک لوم شنی (۵۸/۷) نسبت به خاک رسی (۴۶/۹) حدود ۲۵ درصد بیشتر بود اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. این نتایج نشان می‌دهد که نوع بافت خاک و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن، تأثیر پایه‌ای متفاوتی بر گروه‌های مختلف آنزیمی داشته است.

جدول ۲- نتایج آزمون تی برای مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌ها در دو خاک لوم شنی و رسی  
Table 2. Independent t-test results comparing mean enzyme activities in Sandy Loam and Clay soils

نام آنزیم	بافت خاک	میانگین	انحراف معیار	خطای استاندارد	آماره تی	درجه آزادی*	سطح معنی‌داری	تفاوت میانگین	فاصله اطمینان ۹۵%
اوره‌آز	رسی	46.9	23.8	2.8	-1.89 <sup>ns</sup>	104	0.062	-11.82	(-24.23, 0.58)
فسفاتاز اسیدی	رسی	658	306	36	6.22**	116	0.000	262.1	(178.6, 345.6)
فسفاتاز قلیایی	رسی	663	203	24	-7.44**	131	0.000	-298.5	(-377.8, -219.1)
	لوم شنی	961	273	32					

\*با وجود یکسان بودن تعداد نمونه برای هر سه آنزیم تفاوت در درجه آزادی به دلیل تفاوت در واریانس نمونه‌ها در دو نوع خاک است.

<sup>۲۰</sup> Although the sample size was the same for all three enzymes, the difference in degrees of freedom is due to the difference in sample variances between the two soil types (equal variances not assumed).



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

Figure 1. Statistical comparison and data distribution of enzyme activities in two soil types

### خاک با بافت لوم شنی

در ادامه، نتایج مربوط به خاک با بافت لوم شنی ارائه می‌شود؛ خاکی که به دلیل درصد کمتر رس و ظرفیت تبادل کاتیونی پایین‌تر، معمولاً حساسیت بیشتری نسبت به حضور نانوذرات فلزی دارد. به منظور ارزیابی دقیق پاسخ زیستی این خاک، ابتدا نتایج تجزیه و تحلیل واریانس

(ANOVA) برای سه آنزیم شاخص شامل فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی و اوره‌آز بررسی شده و سپس بر اساس اثرات اصلی و متقابل، روند تغییرات فعالیت آنزیمی در دوره‌های زمانی مختلف ارائه می‌شود. این ساختار امکان مقایسه منسجم اثر نوع نانوذره، غلظت و زمان را فراهم کرده و پایه تفسیرهای بعدی را تشکیل می‌دهد.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات نوع و غلظت نانوذره اکسید فلزی و زمان بر فعالیت آنزیمی در خاک با بافت لوم شنی

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the effects of metal oxide nanoparticle type, concentration, and time on enzyme activities in Sandy Loam soil

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی	فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی	فعالیت آنزیم اوره‌آز
زمان	2	481614**	277 <sup>ns</sup>	10795.4**	
نوع نانوذره	1	134832**	466052**	3034.09*	
غلظت نانوذره	3	56113*	415860**	24940.4**	
تکرار	2	2722	58337**	89.4	
زمان × نانوذره	2	655 <sup>ns</sup>	47549**	1201.5*	
زمان × غلظت نانوذره	6	33843*	66520*	1782.6*	
نوع نانوذره × غلظت نانوذره	3	45601**	68233*	4575.8**	
زمان × نوع نانوذره × غلظت نانوذره	6	32141*	96675**	3725.2**	
خطا	46	13750	47435	241.7	
ضریب تغییرات		18.93	21.36	19.27	

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪؛ ns: غیر معنی‌دار.

\*and \*\*: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively; ns: Not significant.

### فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

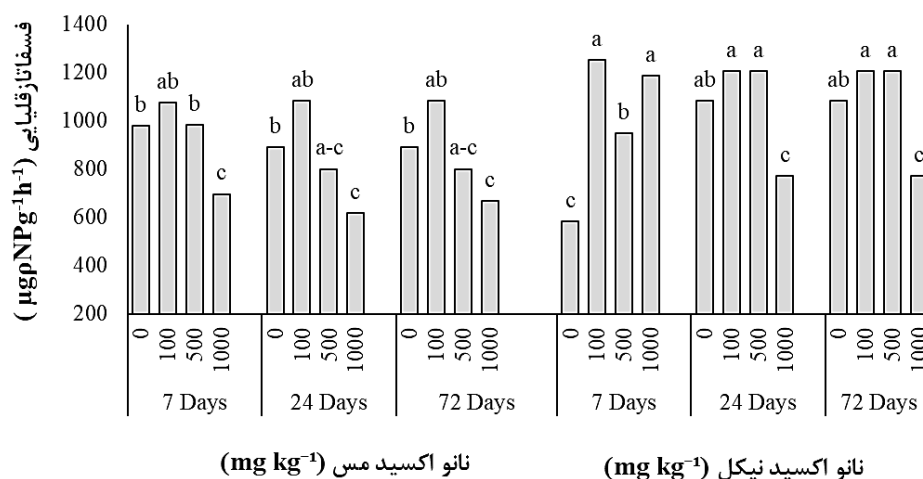
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثرات اصلی نوع و غلظت نانوذره و همچنین اثر متقابل سه‌گانه (زمان × نوع × غلظت) بر فعالیت این آنزیم در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. بررسی مقایسه میانگین اثرات متقابل زمان × نوع نانوذره × غلظت نانوذره (شکل ۲) نشان داد که فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک لوم شنی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی تغییرات معنی‌داری داشته است. در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری (۷، ۲۴، ۷۲ روز)، کمترین میزان فعالیت آنزیمی مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد و غلظت‌های پایین‌تر (۱۰۰

میلی‌گرم) نشان داد. در مقابل، نانوذرات اکسید نیکل رفتار متفاوتی را به نمایش گذاشتند؛ به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در برخی بازه‌های زمانی (به‌ویژه روز ۷)، منجر به تحریک جزئی و افزایش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد شدند که بیانگر وقوع اثر هرمسیس<sup>۲۱</sup> است.

با گذشت زمان از روز ۷ به ۷۲، اگرچه فعالیت آنزیم در تیمارهای نانوذرات مس همچنان در سطوح سرکوب‌شده باقی ماند، اما تیمارهای نانوذرات نیکل پایداری نسبی بیشتری را نشان دادند. به طور کلی، الگوی پاسخ وابسته به دوز<sup>۲۲</sup> برای هر دو اکسید فلزی مشهود بود، اما شیب کاهش فعالیت برای اکسید مس به مراتب تندتر از اکسید نیکل ارزیابی گردید.

<sup>۲۲</sup> Dose-dependent response

<sup>۲۱</sup> Hormesis effect



شکل ۲- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک لوم شنی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 2- Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Alkaline Phosphatase activity in Sandy Loam soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at  $P < 0.05$ .

فرآیندهای زیستی و فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی و ترمیمی در ریزجانداران شود که نتیجه آن افزایش فعالیت متابولیکی و آنزیمی است. نیکل به عنوان یک کوفاکتور ضروری برای برخی آنزیم‌ها (مانند اوره‌آز و هیدروژنازها) عمل می‌کند و در غلظت‌های پایین ممکن است به عنوان کوفاکتور یا محرک متابولیسم عمل نماید، در حالی که مس در غلظت‌های بالا به سرعت آستانه سمیت را رد می‌کند (Datta et al., 2020). همچنین، مشاهده فعالیت بالاتر فسفاتاز قلیایی در خاک لوم شنی نسبت به خاک رسی (در مقایسه کلی) می‌تواند ناشی از کاهش ممانعت فضایی در بافت سبک و دسترس راحت‌تر سوسترها به آنزیم باشد، برخلاف خاک رسی که جذب سطحی شدید ممکن است فعالیت ظاهری را محدود کند (Margasin et al., 2011).

### فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی

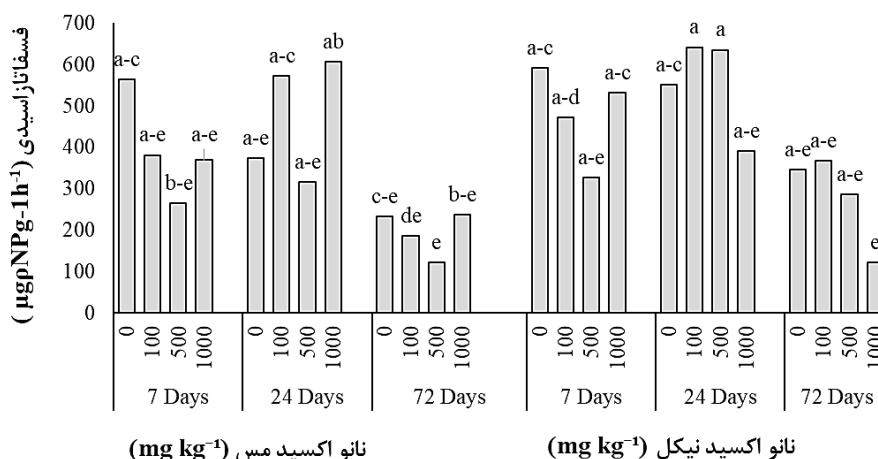
بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، اثر اصلی زمان بر فعالیت فسفاتاز اسیدی معنی‌دار نشد (ns)، اما اثرات اصلی نوع و غلظت نانوذره و برهمکنش‌های متقابل آن‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند. نکته حائز اهمیت، معنی‌دار شدن اثرات متقابل زمان × نوع نانوذره ( $P < 0.01$ ) و زمان × غلظت نانوذره ( $P < 0.05$ ) بود که

کاهش معنی‌دار فعالیت فسفاتاز قلیایی در غلظت‌های بالا، به ویژه در حضور نانوذرات اکسید مس، عمدتاً ناشی از انحلال پذیری بالاتر این نانوذرات و آزادسازی یون‌های مس ( $Cu^{2+}$ ) در محلول خاک است. یون‌های فلزی آزاد شده می‌توانند با گروه‌های عاملی پروتئین‌ها (مانند گروه‌های سولفیدریل، کربوکسیل و ایمیدازول) در جایگاه فعال آنزیم برهمکنش داده و موجب تغییر در ساختار فضایی و غیرفعال شدن آن شوند (Wang et al., 2022). مطالعات پیشین نیز تأیید کرده‌اند که نانوذرات اکسید مس سمیت شدیدتری نسبت به سایر اکسیدهای فلزی (نظیر نیکل و روی) بر جوامع میکروبی و فعالیت‌های آنزیمی خاک (به ویژه فسفاتازها) اعمال می‌کنند (Wu et al., 2020). علاوه بر سمیت یونی، نانوذرات می‌توانند از طریق تماس مستقیم با دیواره سلولی ریزجانداران و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، منجر به تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی و در نهایت مرگ سلول‌های ترشح‌کننده آنزیم شوند (Khan et al., 2023). در مقابل، مشاهده اثر تحریکی در غلظت‌های پایین نانوذرات نیکل (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با پدیده هرم‌سیس قابل توجه است. طبق این پدیده، مقادیر اندک یک عامل تنش‌زا یا سمی می‌تواند موجب تحریک

اکسید نیکل الگوی متفاوتی داشتند؛ در روزهای ابتدایی (روز ۷) حتی در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش شدیدی مشاهده نشد، اما با گذشت زمان و رسیدن به روز ۷۲، فعالیت آنزیم در این غلظت به شدت افت کرد و به پایین‌ترین سطح خود رسید. این تفاوت در شیب تغییرات زمانی نشان می‌دهد که سمیت نیکل برای فسفاتاز اسیدی در خاک لوم شنی دارای یک تأخیر زمانی<sup>۲۳</sup> بوده است، در حالی که نانوذرات مس تنها شوک اولیه ایجاد کرده و سپس اثر بازدارندگی آن‌ها از بین رفته است.

بیانگر وابستگی الگوی پاسخ آنزیم در طول زمان به نوع و غلظت نانوذره است.

مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۳) نشان داد که تأثیر نانوذرات اکسید مس بر فعالیت آنزیم ناپایدار بوده است. در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، تنها در روز ۷ کاهش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد مشاهده شد؛ اما با گذشت زمان، در روز ۲۴ فعالیت آنزیم در این غلظت افزایش یافت (حتی بالاتر از شاهد) و در روز ۷۲ نیز تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد. در مقابل، نانوذرات



شکل ۳- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در خاک لوم شنی طی دوره‌های زمانی مختلف حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 3- Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Acid Phosphatase activity in Sandy Loam soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at  $P < 0.05$ .

محدود کرده‌اند (Rastogi et al., 2017). همچنین، کاهش فعالیت در غلظت‌های بالا می‌تواند ناشی از اتصال مستقیم نانوذرات به جایگاه‌های کاتالیزوری آنزیم فسفاتاز اسیدی و تغییر آرایش ساختاری آن باشد (Wang et al., 2022). نتایج نشان می‌دهد که در بازه‌های زمانی طولانی‌تر (۷۲ روز)، اکسید نیکل در غلظت بالا (۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) سمیت شدیدتری نسبت به اکسید مس بر فسفاتاز اسیدی در خاک لوم شنی اعمال کرده است.

عدم معنی‌داری اثر اصلی زمان ممکن است ناشی از پایداری کلی فسفاتاز اسیدی (که عمدتاً منشأ خارج سلولی دارد) در بافت لوم شنی باشد (Burns et al., 2013)، اما معنی‌داری اثرات متقابل نشان می‌دهد که مکانیسم اثرگذاری دو نانوذره متفاوت بوده است. سمیت تأخیری و شدید نیکل در روز ۷۲ می‌تواند به دلیل حلالیت آهسته‌تر اکسید نیکل و تجمع تدریجی یون‌های  $Ni^{2+}$  در محلول خاک باشد که در نهایت از آستانه تحمل جامعه میکروبی فراتر رفته است (Gong et al., 2019). در مقابل، نانوذرات اکسید مس به دلیل پتانسیل اکسیداسیون بالاتر، احتمالاً سریع‌تر یونیزه شده و با ایجاد تنش اکسیداتیو زود هنگام، فعالیت میکروبی و ترشح آنزیم را

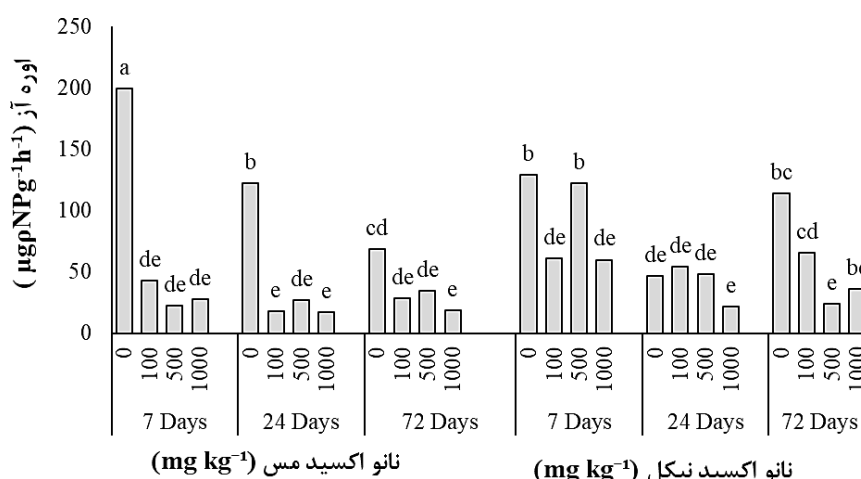
<sup>۲۳</sup> Time-lag

## فعالیت آنزیم اوره‌آز

نتایج آماری (جدول ۳) حاکی از آن بود که تمامی اثرات اصلی و متقابل (دوگانه و سه‌گانه) بر فعالیت اوره‌آز در خاک لوم شنی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند. معنی‌داری اثر متقابل سه‌گانه ( $P < 0.01$ ) بیانگر آن است که روند تغییرات فعالیت آنزیم تحت تأثیر همزمان هر سه فاکتور قرار داشته است.

بررسی مقایسه میانگین‌ها (شکل ۴) نشان داد که فعالیت اوره‌آز به شدت وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت نانوذرات اکسید فلزی، فعالیت آنزیم به طور چشمگیری کاهش یافته است. در تمامی زمان‌ها، بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر

کیلوگرم بود که اختلاف معنی‌داری با شاهد و سایر سطوح داشت. بررسی فاکتور زمان نشان داد که بیشترین سطح فعالیت آنزیمی در روزهای ابتدایی (روز ۷) مشاهده شد و با گذشت زمان روند کاهشی پیدا کرد. مقایسه دو نانوذره حاکی از آن است که اکسید مس در غلظت‌های بالا (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم) سمیت شدیدتر و پایدارتری اعمال کرده است؛ به طوری که فعالیت آنزیم از روز ۷ به ۷۲ به شدت سرکوب شد. در مقابل، اگرچه اکسید نیکل نیز باعث کاهش فعالیت نسبت به شاهد شد، اما در روز ۷۲ (پایان دوره) در تیمارهای نیکل مقداری بازگشت یا نوسان فعالیت مشاهده گردید که نشان‌دهنده تفاوت در الگوی اثرگذاری این دو نانوذره در طول زمان است.



شکل ۴- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک لوم شنی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 4- Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Urease activity in Sandy Loam soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at  $P < 0.05$ .

کلی فعالیت از روز ۷ به روزهای ۲۴ و ۷۲ (به‌ویژه در نمونه‌های شاهد و اکسید مس) را می‌توان به کاهش طبیعی سوبسترا (اوره) در محیط خاک و همچنین اثرات طولانی مدت سمیت نانوذرات نسبت داد. با این حال، نوسان مشاهده شده در تیمارهای نیکل ممکن است ناشی از سازگاری نسبی برخی جوامع میکروبی مقاوم به نیکل در انتهای دوره باشد. نتایج این پژوهش همسو با یافته‌های کیم و همکاران (۲۰۱۵) تأیید می‌کند که نانوذرات اکسید مس به دلیل حلالیت و واکنش‌پذیری شیمیایی بیشتر،

یون‌های فلزی آزاد شده (به‌ویژه مس) با گروه‌های سولفیدریل یا تیول (-SH) که در جایگاه فعال بسیاری از آنزیم‌ها وجود دارند، واکنش می‌دهند. به‌طور اختصاصی در مورد اوره‌آز که یک متالوآنزیم وابسته به نیکل است، یون‌های مس ( $Cu^{2+}$ ) می‌توانند با جایگزینی یون‌های نیکل ( $Ni^{2+}$ ) در مرکز فعال آنزیم، عملکرد کاتالیزوری آن را مختل کنند. این حساسیت با توجه به ماهیت عمدتاً خارج سلولی (Extracellular) اوره‌آز و عدم محافظت آن توسط غشای سلولی تشدید می‌شود. کاهش

پتانسیل بالاتری در مهار فعالیت اوره‌آز نسبت به اکسید نیکل در خاک لوم شنی دارند (Kim et al., 2015).

### خاک با بافت رسی

در ادامه، نتایج مربوط به خاک با بافت رسی ارائه می‌شود. خاک‌های رسی به دلیل درصد بالاتر ذرات رس، ظرفیت تبادل کاتیونی بیشتر و سطح ویژه بالاتر، توانایی بیشتری در جذب و نگهداشت یون‌ها و ذرات فلزی دارند و از این رو ممکن است الگوی متفاوتی از

پاسخ‌های زیستی در مواجهه با نانوذرات فلزی نشان دهند. به منظور بررسی این موضوع، اثر نوع و غلظت نانوذرات اکسید فلزی و همچنین عامل زمان بر فعالیت آنزیم‌های شاخص خاک شامل فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی و اوره‌آز در این خاک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس ابتدا برای تعیین معنی‌داری اثرات اصلی و متقابل ارائه شده و سپس تغییرات فعالیت آنزیمی در تیمارهای مختلف بر اساس مقایسه میانگین‌ها مورد تفسیر قرار می‌گیرد تا الگوی پاسخ آنزیم‌ها در خاک رسی با دقت بیشتری مشخص شود.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثرات نوع و غلظت نانوذره اکسید فلزی و زمان بر فعالیت آنزیمی در خاک با بافت رسی  
Table 4- Analysis of variance (ANOVA) for the effects of metal oxide nanoparticle type, concentration, and time on enzyme activities in Clay soil

میانگین مربعات		درجه آزادی	منبع تغییرات
فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی	فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی		
88.96 <sup>ns</sup>	116077*	2	زمان
6894.11**	200289**	1	نوع نانوذره
3994.41**	83020*	3	غلظت نانوذره
22.46	10657	2	تکرار
2803.24**	159271*	2	زمان × نانو ذره
946.71**	173594*	6	زمان × غلظت نانو ذره
271.65 <sup>ns</sup>	86867*	3	نوع نانوذره × غلظت نانوذره
455.60**	476585**	6	زمان × نوع نانوذره × غلظت نانوذره
135.66	31748	46	خطا
14.45	17.36		ضریب تغییرات

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪؛ ns: غیر معنی‌دار.

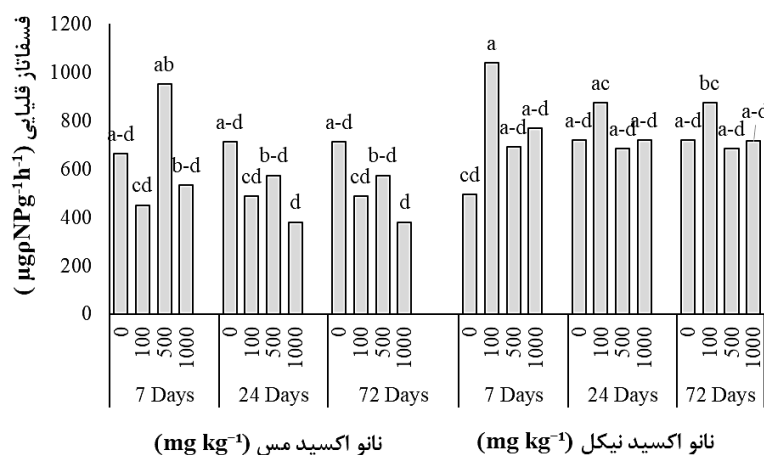
\*and \*\*: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively; ns: Not significant.

### فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

طبق نتایج جدول ۴، اثر اصلی زمان بر فعالیت این آنزیم در خاک رسی معنی‌دار نبود؛ که بیانگر پایداری نسبی فعالیت این آنزیم در طول دوره انکوباسیون (۷ تا ۷۲ روز) است. با این وجود، اثرات اصلی نوع نانوذره ( $P < 0.01$ ) و غلظت نانوذره ( $P < 0.05$ ) و اثر متقابل سه‌گانه (زمان × نوع نانوذره × غلظت نانوذره) معنی‌دار بودند.

مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۵) نشان داد که نانوذرات اکسید مس در مقایسه با اکسید نیکل، اثر بازدارندگی

شدیدتری بر فعالیت آنزیم داشته‌اند. در تیمار نانوذرات مس، با افزایش غلظت به ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فعالیت آنزیم در تمام زمان‌ها کاهش یافت و در روزهای ۲۴ و ۷۲ به پایین‌ترین سطح آماری رسید. در مقابل، نانوذرات نیکل در اکثر غلظت‌ها تأثیر منفی معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند و حتی در برخی موارد (مانند غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در روز ۷) منجر به افزایش فعالیت آنزیم و ثبت بیشترین میزان فعالیت شدند. مقایسه دو نانوذره نشان می‌دهد که خاک رسی در برابر سمیت نیکل مقاومت بیشتری از خود نشان داده، اما همچنان نسبت به غلظت‌های بالای مس آسیب‌پذیر بوده است.



شکل ۵- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک با بافت رسی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

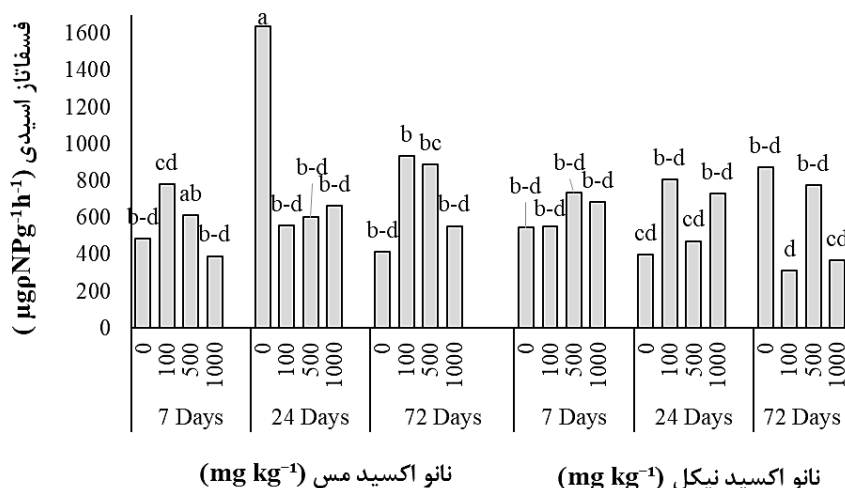
Figure 5. Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Alkaline Phosphatase activity in Clay soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at  $P < 0.05$ .

### فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴) نشان داد که تمامی اثرات اصلی شامل زمان ( $P < 0.05$ )، نوع نانوذره ( $P < 0.01$ ) و غلظت نانوذره ( $P < 0.05$ ) و همچنین اثرات متقابل زمان  $\times$  نوع نانوذره بر فعالیت فسفاتاز اسیدی در خاک رسی معنی‌دار بودند.

بررسی مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۶) نشان داد که نانوذرات اکسید مس در غلظت‌های بالا، تأثیر بازدارندگی شدیدی را به‌ویژه در روز ۲۴ اعمال کرده‌اند؛ در این روز، فعالیت آنزیم در تیمار شاهد به حداکثر میزان خود رسید، اما حضور نانوذرات مس (حتی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم) مانع از این افزایش شدید شد و فعالیت را به کمتر از نصف کاهش داد. در مقابل، نانوذرات اکسید نیکل الگوی نوسانی‌تری داشتند. در روزهای اولیه (روز ۷)، غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم حتی باعث تحریک جزئی فعالیت نسبت به شاهد شدند، اما با گذشت زمان و رسیدن به روز ۷۲، در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم کاهش فعالیت نسبت به شاهد مشاهده گردید. این تفاوت در الگوی پاسخ نشان می‌دهد که سمیت نیکل در خاک رسی با تأخیر زمانی ظاهر شده و در انتهای دوره خود را نشان داده است.

عدم معنی‌داری اثر زمان در خاک رسی را می‌توان به ظرفیت بافری بالاتر و حضور مقادیر بیشتر کلئیدهای رس (۴۹/۸ درصد) و کربن آلی (۱/۳۷ درصد) در این خاک نسبت داد. این ترکیبات می‌توانند با جذب سطحی نانوذرات و یون‌های فلزی آزاد شده، از تماس مستقیم آن‌ها با سلول‌های میکروبی و آنزیم‌ها جلوگیری کرده و سمیت آن‌ها را تعدیل کنند (Mishra and Kumar, 2009). با این حال، سمیت شدیدتر نانوذرات اکسید مس نسبت به نیکل در این خاک نیز مشهود است که ناشی از انحلال‌پذیری بیشتر مس و توانایی بالای یون‌های  $Cu^{2+}$  در ایجاد تنش اکسیداتیو و اختلال در فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز است. پایداری فعالیت آنزیم در حضور نانوذرات نیکل احتمالاً به دلیل تشکیل کمپلکس‌های پایدار نیکل-رس یا نیکل-ماده آلی است که زیست‌فراهمی این فلز را کاهش داده و به ریزجانداران فرصت سازگاری داده است. این نتایج تأیید می‌کند که بافت خاک نقش کلیدی در تعیین سرنوشت و سمیت نانوذرات فلزی ایفا می‌کند و خاک‌های سنگین‌تر پتانسیل بالاتری برای کاهش اثرات سوء این آلاینده‌ها دارند (Joško et al., 2014).



شکل ۶- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در خاک با بافت رسی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 6. Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Acid Phosphatase activity in Clay soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at  $P < 0.05$ .

(روز ۲۴) مهار کند (Wang et al., 2022) کاهش فعالیت در روز ۷۲ برای نانوذره نیکل در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نشان‌دهنده اثرات تجمعی و بلندمدت فلزات سنگین بر جمعیت میکروبی و آنزیم‌های خاک است.

### فعالیت آنزیم اوره‌آز

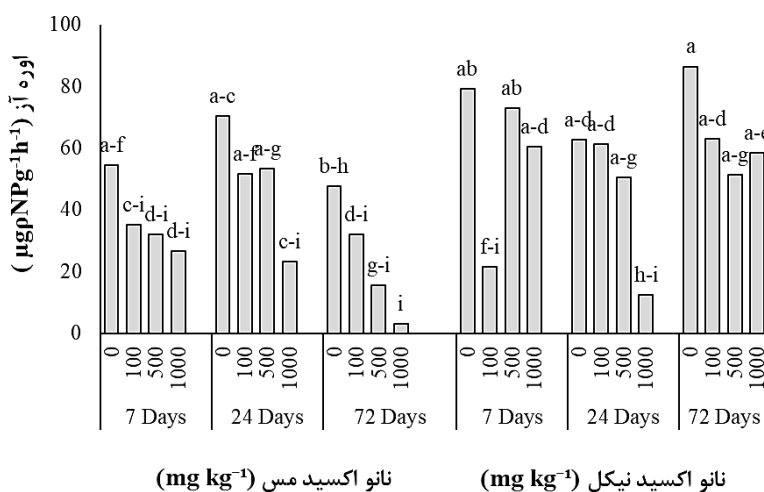
نکته قابل توجه در نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴)، غیرمعنی‌دار شدن اثر اصلی زمان بر فعالیت اوره‌آز در خاک رسی است، در حالی که این اثر در خاک لوم شنی در سطح ۱ درصد معنی‌دار گزارش شده بود. این عدم معنی‌داری نشان‌دهنده ثبات و پایداری نسبی آنزیم اوره‌آز در بستر خاک رسی طی دوره ۷۲ روزه است. با این وجود، اثرات اصلی نوع نانوذره و غلظت نانوذره همچنان در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند و معنی‌دار شدن اثر متقابل سه‌گانه زمان × نوع نانوذره × غلظت نانوذره ( $P < 0.01$ ) بیانگر پیچیدگی پاسخ آنزیم و وابستگی همزمان آن به هر سه فاکتور است.

مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۷) نشان داد که نانوذرات مس سمیت به مراتب بیشتری را نسبت به نیکل در مهار فعالیت اوره‌آز در این خاک اعمال کرده‌اند؛ به

تفاوت در رفتار سمیت نانوذرات مس و نیکل در خاک رسی را می‌توان به ویژگی‌های کلوئیدی خاک و شیمی سطح نانوذرات نسبت داد. خاک رسی به دلیل داشتن ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) بالا و گروه‌های عاملی منفی روی سطح ذرات رس و ماده آلی، توانایی بالایی در جذب سطحی کاتیون‌های فلزی و نانوذرات دارد. در مورد نیکل، احتمالاً در روزهای ابتدایی، جذب سطحی قوی نانوذرات بر روی کلوئیدهای رس باعث کاهش زیست‌فراهمی یون‌های  $Ni^{2+}$  و تعدیل سمیت شده است، اما با گذشت زمان و اشباع سایت‌های جذبی یا تغییر در حلالیت نانوذرات (Aging)، یون‌های نیکل آزاد شده و سمیت خود را نشان داده‌اند (Gong et al., 2019). در مقابل، اگرچه مس به طور کلی تمایل بالایی به تشکیل کمپلکس‌های پایدار با ماده آلی خاک دارد که می‌تواند زیست‌فراهمی آن را کاهش دهد، اما در غلظت‌های بکار رفته در این آزمایش، احتمالاً ظرفیت کمپلکس‌سازی ماده آلی خاک اشباع شده است؛ بنابراین، مس آزاد شده به دلیل تمایل شدید به واکنش با گروه‌های عاملی پروتئین‌ها (آنزیم‌ها)، حتی در حضور کلوئیدهای خاک نیز توانسته است با جایگاه‌های فعال آنزیم برهمکنش داده و فعالیت کاتالیزوری آن را به ویژه در زمان اوج فعالیت میکروبی

شد، در حالی که در تیمار مشابه نیکل، سطح قابل توجهی از فعالیت آنزیمی حفظ گردید.

طوری که در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات مس، فعالیت آنزیم در انتهای دوره (روز ۷۲) تقریباً متوقف



شکل ۷- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک با بافت رسی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 7. Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Urease activity in Clay soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at  $P < 0.05$ .

در مقابل، مس ( $Cu^{2+}$ ) به عنوان یک بازدارنده قوی غیررقابتی یا مخلوط، با گروه‌های تیول (-SH) مربوط به اسید آمینه سیستئین در زبانه<sup>۲۴</sup> جایگاه فعال آنزیم واکنش می‌دهد. این برهمکنش منجر به تغییرات آرایش ساختاری شدید و بلوکه شدن جایگاه فعال شده و عملکرد آنزیم را مختل می‌کند (Kim et al., 2015). نتایج این پژوهش همسو با یافته‌های بیک و آن (۲۰۱۱) نشان می‌دهد که در خاک رسی نیز علی‌رغم وجود ظرفیت بافری بالا، غلظت‌های بالای مس به دلیل انحلال‌پذیری و واکنش‌پذیری بالاتر، توانسته‌اند بر مکانیسم‌های محافظتی خاک غلبه کرده و فعالیت آنزیم را سرکوب کنند (Baek and An, 2011).

### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که سمیت نانوذرات اکسید فلزی بر فعالیت‌های آنزیمی خاک، تابعی پیچیده از برهمکنش میان نوع نانوذره، ویژگی‌های بافتی خاک و مدت زمان تماس است. یافته‌ها حاکی از آن بود که بافت

پایداری فعالیت اوره‌آز در خاک رسی (عدم تأثیرپذیری از فاکتور زمان) را می‌توان به تشکیل کمپلکس‌های پایدار آنزیم-رس و آنزیم-هوموس نسبت داد. اوره‌آز به عنوان یک آنزیم خارج سلولی، دارای گروه‌های عاملی باردار است که می‌توانند با سطح کلونیدهای رس و مواد آلی (که در این خاک به ترتیب ۴۹/۸ و ۱/۳۷ درصد بودند) پیوند برقرار کنند. این تثبیت فیزیکی و شیمیایی، آنزیم را در برابر تجزیه پروتئینی و تغییرات نامطلوب محیطی محافظت کرده و پایداری کاتالیزوری آن را در طول زمان به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد.

در خصوص تفاوت سمیت نانوذرات، اوره‌آز یک متالوآنزیم وابسته به نیکل است و وجود مقادیر متعادل یون نیکل  $Ni^{2+}$  در جایگاه فعال برای حفظ ساختار چهارم و فعالیت کاتالیزوری آن ضروری است. از این رو، ریزجانداران و آنزیم‌های آزاد اوره‌آز به طور ذاتی تحمل بالاتری نسبت به نانوذرات نیکل دارند و حتی در غلظت‌های پایین ممکن است اثر تحریکی مشاهده شود.

<sup>۲۴</sup> Flap

ارزیابی ریسک اکولوژیک نانوذرات مهندسی شده، نباید تنها بر غلظت تمرکز کرد، بلکه ظرفیت محافظتی خاک و ماهیت دینامیک سمیت در طول زمان، پارامترهای حیاتی برای پیش‌بینی سلامت اکوسیستم‌های خاکی هستند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج جهت فراهم آوردن امکانات انجام این پژوهش تشکر و قدردانی نمایند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی در خصوص انتشار این مقاله وجود ندارد.

خاک نقش تعیین‌کننده‌ای در تعدیل شدت تنش دارد؛ به‌طوری‌که خاک رسی به واسطه محتوای بالاتر رس و ماده آلی، از طریق مکانیسم‌های تثبیت فیزیکی و تشکیل کمپلکس‌های رس-نانوذره-آنزیم، پایداری قابل‌توجهی برای آنزیم‌ها (به‌ویژه اوره‌آز) فراهم کرد. در مقابل، خاک لوم‌شنی به دلیل فقر کلوئیدی و ظرفیت بافری پایین، حساسیت بسیار بالایی به آلاینده‌ها نشان داد و شدیدترین کاهش فعالیتهای آنزیمی در این بستر مشاهده شد. از منظر نوع آلاینده، نانوذرات اکسید مس به دلیل انحلال‌پذیری بالاتر و تمایل شدید یون‌های مس به واکنش با گروه‌های تیول در جایگاه فعال آنزیم‌ها، سمیت شدیدتر و پایداری را نسبت به نانوذرات اکسید نیکل اعمال کردند. اکسید نیکل رفتاری متفاوت شامل اثرات تحریکی در غلظت‌های پایین و سمیت تأخیری در انتهای دوره آزمایش از خود نشان داد. این مطالعه تأکید می‌کند که در

## References

1. Aliasgharzarad, N., 2026. Implication of biological indices for assessing soil health. *Journal of Soil Biology*, 13(2), 171–191. <https://doi.org/10.22092/sbj.2025.370174.283>
2. Alkorta, I., Epelde, L. and Garbisu, C., 2017. Environmental parameters altered by climate change affect the activity of soil microorganisms involved in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 364(19), fnx200. DOI: 10.1093/femsle/fnx200
3. Baek, Y.W. and An, Y.J., 2011. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 409(8), pp.1603-1608. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.01.014
4. Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N. and Zoppini, A., 2013. Soil enzymes: A key to nature's cycling of nutrients. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, pp.216-234 .
5. Cornelis, G., Hund-Rinke, K., Kuhlbusch, T., van den Brink, N. and Nickel, C., 2014. Fate and effect of engineered nanomaterials in soils and soil organisms. *Ecotoxicology*, 23(8), pp.1603-1628. DOI: 10.1007/s10646-014-1262-1
6. Cui, Y., Fang, L., Deng, Y., Guo, X. and Zhang, X., 2022. Patterns of soil extracellular enzyme activities and their stoichiometry in relation to soil properties in the loess plateau, China. *Catena*, 217, p.106503. DOI: 10.1016/j.catena.2022.106503
7. Datta, R., Baraniya, D., Wang, S., Kelkar, A., Meena, R.S., Yadav, G.S., Teresa Ceccherini, M. and Formoon, J., 2020. Amino acid: its dual role as a plant growth promoter and bio-stimulant in sustainable agriculture. In *Carbon and Nitrogen Cycling in Soil* (pp. 175-188). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-7264-3\_6
8. Datta, R., Baraniya, D., Wang, S., Kelkar, A., Meena, R.S., Yadav, G.S., Teresa Ceccherini, M. and Formoon, J., 2020. Amino acid: its dual role as a plant growth promoter and bio-stimulant in sustainable agriculture. In *Carbon and Nitrogen Cycling in Soil* (pp. 175-188). Springer, Singapore.
9. Eivazi, F. and Tabatabai, M.A., 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(3), pp.167-172. DOI: 10.1016/0038-0717(77)90070-0
10. Faisal, S., Jan, H., Shah, S.A., Shah, S., Khan, A., Akbar, M.T., Rizwan, M., Jan, F., Wajidullah, N., Akhtar, N. and Khattak, A., 2024. Green synthesis of nickel oxide nanoparticles using *Punica granatum* peel extract and their applications as photocatalyst and antibacterial agent. *Results in Physics*, 56, p.107263. DOI: 10.1016/j.rinp.2023.107263
11. Fallah Nosratabad, A., & Khoshru, B., 2024. Potentials and challenges of biofertilizers in sustainable agriculture. *Journal of Soil Biology*, 12(1), 19–63. <https://doi.org/10.22092/sbj.2024.366090.265>
12. Gee, G.W. and Bauder, J.W., 1986. Particle-size analysis. In: A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Part I—Physical and Mineralogical Methods* (pp. 383-411). SSSA Book Series, No. 5, ASA and SSSA, Madison. DOI: 10.2136/sssabookser5.1.2ed.c15
13. Gong, X., Huang, D., Liu, Y., Zeng, G., Chen, S., Wang, R., Deng, J. and Cheng, M., 2019. Toxic effects of nickel oxide nanoparticles on soil enzyme activities and microbial community. *Chemosphere*, 215, pp.56-64. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.176
14. Gong, X., Huang, D., Liu, Y., Zeng, G., Chen, S., Wang, R., Deng, J. and Cheng, M., 2019. Toxic effects of nickel oxide nanoparticles on soil enzyme activities and microbial community. *Chemosphere*, 215, pp.56-64.
15. Joško, I., Oleszczuk, P. and Futa, B., 2014. The effect of inorganic nanoparticles (ZnO, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO and Ni) and their bulk counterparts on enzyme activities in different soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(8), pp.2311-2320. DOI: 10.1007/s13762-013-0427-y
16. Khan, M.N., Li, Y., Khan, Z., Chen, L., Liu, Y., Khan, Z., Wu, H. and Li, Z., 2023. Nanoparticles in sustainable agriculture: Recent advances, challenges, and future perspectives. *Chemosphere*, 312, p.137286. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.137286
17. Khan, M.N., Li, Y., Khan, Z., Chen, L., Liu, Y., Khan, Z., Wu, H. and Li, Z., 2023. Nanoparticles in sustainable agriculture: Recent advances, challenges, and future perspectives. *Chemosphere*, 312, p.137286.

18. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Khosravi, H., Asgharzadeh, A., & Faridian, L., 2025. Enhancing agricultural productivity using PGPR and nanoparticles: Mechanisms, challenges, and future directions. *Journal of Soil Biology*, 12(2), 279–313. <https://doi.org/10.22092/sbj.2025.368425.277>
19. Kim, S., Kim, J. and Lee, I., 2015. Effects of copper nanoparticles on soil enzyme activities and bacterial community composition. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(4), pp.265-271. DOI: 10.1080/03601234.2015.999602
20. Mishra, V.K. and Kumar, A., 2009. Impact of metal nanoparticles on the plant growth promoting rhizobacteria. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4(3), pp.587-592. URL: [http://www.chalcogen.ro/587\\_Mishra.pdf](http://www.chalcogen.ro/587_Mishra.pdf)
21. Parween, T., Jan, S. and Mahmooduzzafar, 2021. Bio-interaction of CuO nanoparticles with agricultural crops: A review. *Vegetos*, 34, pp.1-12. DOI: 10.1007/s42535-020-00173-w
22. Rajput, V.D., Minkina, T., Sushkova, S., Mandzhieva, S., Singh, R., Burachevskaya, M. and Chaplygin, V., 2021. Nano-biochar: A novel solution for sustainable agriculture and environmental remediation. *Environmental Geochemistry and Health*, 44, pp.1-22. DOI: 10.1007/s10653-021-01168-w
23. Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H.M., He, X., Mbarki, S. and Brestic, M., 2017. Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review. *Frontiers in Chemistry*, 5, p.78. DOI: 10.3389/fchem.2017.00078
24. 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), pp.29-38. DOI: 10.1097/00010694-193401000-00003
25. Wang, J., Wang, J., Zhang, Z. and Dong, Y., 2022. Environmental risks of metal-based engineered nanoparticles in soil: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 20, pp.2393–2407. DOI: 10.1007/s10311-022-01438-x
26. Wang, J., Wang, J., Zhang, Z. and Dong, Y., 2022. Environmental risks of metal-based engineered nanoparticles in soil: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 20, pp.2393–2407.
27. Wu, J., Yu, Z., Cai, L. and Sun, Y., 2020. Ecotoxicity of copper oxide nanoparticles to soil microorganisms: A review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 105, pp.1-9. DOI: 10.1007/s00128-020-02917-y
28. Wu, J., Yu, Z., Cai, L. and Sun, Y., 2020. Ecotoxicity of copper oxide nanoparticles to soil microorganisms: A review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 105, pp.1-9.
29. Yousefi, S., Kartoolinejad, D. and Naghdi, R., 2023. Effects of metal oxide nanoparticles on soil enzyme activities and microbial biomass in a forest soil. *Eurasian Journal of Soil Science*, 12(1), pp.55-63. DOI: 10.18393/ejss.1130638
30. Zantua, M.I. and Bremner, J.M., 1977. Stability of urease in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(2), pp.135-140. DOI: 10.1016/0038-0717(77)90050-5.