



Gonbad Kavous University  
Journal of New Approaches in  
Water Engineering and Environment  
Volume 1, Issue 2

## **Fast spectrophotometric measurement of nitrate in water, soil and plant**

**Sajad Amirhajloo<sup>1\*</sup>, Mahdi Gheysari<sup>2</sup>, Mohamad Shayannejad<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>PhD Student in Irrigation and Drainage, Department of Irrigation, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Irrigation, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

<sup>3</sup>Associate Professor, Department of Irrigation, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received: 24.08.2022; Accepted: 26.11.2022

### **Abstract:**

Considering the plant's positive response to nitrogen, farmers consume nitrogen fertilizers as much as possible. Excessive consumption of nitrogen fertilizers imposes additional costs on farmers, environmental pollution and direct negative impact on human health. Therefore, it is important to determine the amount of nitrogen-nitrate in the soil, plant and irrigation water in order to use nitrogen fertilizers optimally. In addition, according to the nitrogen balance, the amount of nitrogen deficiency is calculated and given to the plant, therefore the overuse of fertilizer is avoided. Most of the usual methods for nitrate measurement are time-consuming and expensive, spectroscopic measurement (spectrophotometer) makes it possible to determine the amount of nitrogen-nitrate in each of the soil, water and plant in the shortest time, inexpensively and accurately. In this research, we introduced a quick method of measuring the amount of nitrate in each of the water, soil and plant. The results are presented in terms of practical units in the field and soil for farmers and students, including kilograms of nitrogen per ton of product and the amount of nitrogen given through irrigation or nitrogen available in the soil in kilograms per hectare.

**Keywords:** pollution, spectrophotometry, colorimetry, environment, Nitrogen

---

\* Corresponding author, Email: Amirhajloo\_1105@yahoo.com



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "رویکردهای نوین در مهندسی آب و محیط زیست"

دوره اول، شماره دوم

<http://Nawee.gonbad.ac.ir>

## اندازه‌گیری نیتрат موجود در آب، خاک و گیاه به روش سریع طیف‌سنجی

سجاد امیرحاجلو<sup>۱\*</sup>، مهدی قیصری<sup>۲</sup>، محمد شایان‌نژاد<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری آبیاری و زهکشی، گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۵

### چکیده

با توجه به پاسخ مثبت گیاه به نیتروژن، کشاورزان به هر میزان که کودهای نیتروژنی در دست داشته باشند، از آنها استفاده می‌کنند. مصرف زیاد کودهای نیتروژنی علاوه بر تحمیل هزینه اضافی بر کشاورز، باعث آلودگی محیط زیست و تأثیر مستقیم بر سلامت انسان نیز می‌شود. بنابراین ضروری است برای استفاده بهینه از کودهای نیتروژنی، مقدار نیتروژن-نیتراتی موجود در خاک، گیاه و آب آبیاری مشخص شود و در نهایت با توجه به بیلان نیتروژن میزان کمبود نیتروژن محاسبه و به گیاه داده شود و از کاربرد کود بیشتر اجتناب شود. بیشتر روش‌های معمول برای اندازه‌گیری نیترات زمانبر و گران قیمت هستند. اندازه‌گیری به روش طیف‌سنجی (اسپکتروفوتومتر) این امکان را فراهم می‌کند که در کمترین زمان با کمترین هزینه و با دقت مناسبی میزان نیتروژن-نیتراتی در هر یک از محیط‌های خاک، گیاه و آب را محاسبه کرد. در این پژوهش علاوه بر معرفی روش سریع اندازه‌گیری میزان نیترات در هر یک از محیط‌های آب، خاک و گیاه، نتایج برحسب واحدهای کاربردی در مزرعه و قابل درک برای کشاورزان و دانشجویان از جمله کیلوگرم نیتروژن در هر تن محصول، و میزان نیتروژن به‌کاررفته از طریق آبیاری یا نیتروژن موجود در خاک برحسب کیلوگرم بر هکتار زمین ارائه شد. کلمات کلیدی: آلودگی، اسپکتروفوتومتری، رنگ‌سنجی، محیط زیست، نیتروژن.

\* نویسنده مسئول، Email: amirhajloo\_1105@yahoo.com

## مقدمه

بیشتر خاک‌ها د چار کمبود فرم‌های قابل جذب نیتروژن برای گیاه (نیترات و آمونیم) هستند. یکی از مهم‌ترین دلایل این کمبود قابلیت آبشویی زیاد نیترات است که سبب شده است نیتروژن مورد نیاز گیاه به صورت نهاده به زمین داده شود (Ata-Ul-Karim et al., 2014). به دلیل اینکه عملکرد و پاسخ مثبت گیاهان در جذب نیتروژن دیده شده است، این تفکر غلط بین کشاورزان نهادینه شده است که هر چقدر کود نیتروژن بیشتری به زمین داده شود، شاهد بازدهی بیشتری خواهند بود. طی چهل سال گذشته، با افزایش دو برابری تولید محصولات کشاورزی در سطح دنیا، استفاده از کودهای نیتروژنی هفت برابر بیشتر شده است (Eickhout et al., 2006).

اگر چه کمبود نیتروژن در خاک معمولاً برای رشد گیاه محدودیت محسوب می‌شود، با این حال مقادیر زیاد این عنصر در خاک نیز مشکلات زیست‌محیطی ایجاد می‌کند؛ مصرف زیاد کودهای نیتروژنی در زمین‌های کشاورزی و انباشته شدن نیتروژن مازاد در خاک، موجب می‌شود در اثر بارندگی‌های شدید یا آبیاری نامناسب، نیترات خاک همراه آب نفوذ عمقی وارد منابع آب زیرزمینی شود و یا از طریق روان‌آب وارد آب‌های سطحی شود. این تلفات علاوه بر آلودگی منابع آب باعث تخریب محیط زیست، گرمایش کره زمین از طریق انتشار گاز  $N_2O$ ، لطمات جبران ناپذیری به سلامت انسان وارد می‌کند و باعث ایجاد سرطان‌های گوارشی و تنفسی می‌شود (Chandna et al., 2011; Kaiser, 2001; Manassaram et al., 2010; Sepaskhah, 2010). همچنین سوزاندن سوخت‌های فسیلی مانند نفت گاز در نیروگاه‌ها و ماشین‌های صنعتی و خودروها باعث ایجاد اکسیدهای نیتروژن می‌شود و بخشی از این اکسیدها ممکن است هنگام بارش باران به منابع سطحی و زیر زمینی وارد شود. نیترات در آب و خاک تحرک زیادی دارد، اما قابلیت تبخیر ندارد؛ بنابراین پایش نیترات به عنوان یکی از منابع آلاینده آب و خاک ضروری است.

در سال‌های اخیر توجه به مسائل زیست محیطی بیش از قبل شده است و تحقیقات متعددی در خصوص آلودگی، آب، خاک و گیاه به نیترات صورت می‌گیرد، Seilsepour (2022) غلظت نیترات و فلزات سنگین در خاک و اندام

خوراکی کاهو در مزارع دشت ورامین را اندازه‌گیری کردند، Moosavinasab and Gholamzadeh (2021) آلودگی نیترات در منابع آب زیرزمینی و محصولات کشاورزی در دشت فسا را مورد سنجش قرار دادند. Shokrian et al (2021) به ارزیابی آلودگی نیترات منابع آب زیرزمینی دشت ساری پرداختند، Akbari Asrami et al (2021) وضعیت آلودگی دریای خزر به نیترات را مورد بررسی قرار دادند.

مشخص کردن میزان نیترات موجود در خاک، گیاه و آب برای مشخص کردن میزان نیترات مورد نیاز مصرفی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این راستا محققان دانشگاه و بخش اجرا بسیار علاقه‌مند به تحقیق و بررسی سرنوشت نیتروژن در چرخه خاک، آب و گیاه هستند و دانشجویان زیادی در کشور درباره این موضوع با اهداف مختلف پژوهش می‌کنند. به دلیل اینکه موضوع آلودگی نیترات در دانشکده‌ها و گروه‌های مختلف بررسی می‌شود و تجهیزات و تکنسین ماهر همه جا در دسترس نیست و از طرفی در بیشتر موارد دانشجویان اطلاعات دقیق از روش کار ندارند، سرمایه‌گذاری ریالی و وقت صرف شده برای این آزمایش‌ها ممکن است به نتیجه مطلوب نرسد. در این مقاله ضمن تشریح مختصر تلفات نیتروژن، روش‌های اندازه‌گیری نیترات در آب، خاک و گیاه با روش طیف‌سنجی تشریح شده است. (Karrat et al (2022، استفاده روش طیف‌سنجی را به عنوان روش دوستدار محیط زیست توصیه کرده‌اند، سایر محققان از جمله (Wu et al (2016، Bulgariu and (García-Robledo et al (2014 و (Bulgariu, 2012 نیز از روش طیف‌سنجی برای اندازه‌گیری نیترات استفاده کرده‌اند.

## مواد و روش‌ها

### اندازه‌گیری نیترات آب

میزان غلظت مجاز نیترات در آب برای شرب حیوانات مشابه محدوده توصیه شده برای آشامیدن انسان است. با این حال استاندارد کیفیت آب در مورد حیوانات مختلف و حتی فصول مختلف، متفاوت است. معمولاً چون در تابستان مقدار مصرف آب حیوانات بیشتر است، حد مجاز نیترات موجود در آب در این فصل کمتر است. بیشترین مقدار مجاز نیترات در آب آشامیدنی برای حیوانات ۱۰۰

میلی گرم بر لیتر است (Stephan et al., 1985). این استاندارد بیشتر در مورد حیوانات جوان صادق است و حیوانات مسن تر ممکن است غلظت‌های بیشتر از ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نیترات را نیز تحمل کنند (Self and Waskom, 2008). جدول ۱ حد مجاز غلظت نیترات در آب مصرفی انسان را نشان می‌دهد.

جدول ۱- استاندارد آب آشامیدنی

حداکثر مجاز نیترات (mg/lit)		
سازمان بهداشت جهانی (Ward et al., 2005) WHO	سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA) (Weyer et al., 2001)	اتحادیه اروپا (Wolff and Wasserman, 1972)
۴۵	۴۵	۵۰

ساده‌ترین روش در سنجش میزان نیترات یک نمونه آب و یا پساب، به دلیل اینکه یون نیترات در ناحیه فراینگش جذب دارد سنجش مقدار جذب مربوط به باند جذبی  $N=O$  در طول موج ۲۲۰ نانومتر است. به منظور از بین بردن مزاحمت کربنات‌ها و کدورت هیدروکسیدها، به نمونه مقداری هیدروکلریک اسید رقیق اضافه می‌شود؛ با این حال سنجش نیترات با این روش در نمونه‌های با رنگ و کدورت بالا و یا نمونه‌هایی که مقدار مواد آلی محلول، نیتريت، شوینده‌ها و  $Cr^{+6}$  در آنها زیاد است مناسب نیست و در صورت بالا بودن این عناصر ترجیحاً از روش‌های

#### روش نمونه برداری

نمونه برداری از آب بر اساس شیوه‌نامه انجمن بهداشت عمومی آمریکا (APHA) انجام می‌شود.

جدول ۲- شیوه‌نامه نمونه برداری آب برای اندازه‌گیری نیترات (APHA)

نوع پارامتر	نوع ظرف	حجم نمونه (میلی لیتر)	شرایط نگهداری	حداکثر زمان نگهداری قبل آزمایش
نیترات	پلاستیک یا شیشه	۲۵۰	در جای خنک نگهداری شود	۲۴ ساعت
			در محل نمونه برداری فیلتر (با صافی ۰/۴۵ میکرومتر) و منجمد گردد.	۱ ماه

۳- محلول‌های استاندارد: مقدار ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۵ میلی لیتر از محلول استاندارد واسطه برداشته و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شود. محلول‌های استاندارد ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۵ میلی گرم بر لیتر نیترات به دست می‌آید (برای افزایش دقت آزمایش می‌توان نمونه استاندارد را با غلظت‌های متفاوت ساخت).

۴- محلول هیدروکلریک اسید ۱ مولار: ۰/۸۵ میلی لیتر هیدروکلریک اسید (HCL) غلیظ را باید به آرامی و با احتیاط در زیر هود با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رساند.

#### روش انجام آزمایش

#### تجهیزات مورد نیاز

اسپکتروفوتومتر دارای طول موج ۲۲۰ و ۲۷۵ نانومتر - سل نگهداری نمونه در اسپکتروفوتومتر (کوآرتزی)

#### مواد شیمیایی مورد نیاز

۱- محلول استاندارد مادر (میلی گرم بر لیتر ۱۰۰۰):  
۱/۶۳۰۶ گرم از نمک جامد نیترات پتاسیم که قبلاً در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس آون خشک شده است به حجم ۱۰۰۰ سی سی رسانده شود.

۲- محلول استاندارد واسطه: غلظت محلول مادر به ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کاهش داده می‌شود. برای این کار ۵۰ میلی لیتر از محلول استاندارد به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود.

نیتрат اضافه شده به خاک مزرعه به دست می‌آید:

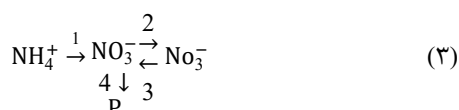
$$\frac{700}{1000} (m) \times \frac{10000m^2}{1ha} \times \frac{35mg}{lit} \times \frac{1kg}{10^6mg} \times \frac{1000lit}{1m^3} = 245 \frac{kg}{ha} NO_3 \quad (2)$$

ضریب تبدیل نیترات به نیتروژن-نیتراتی ۰/۲۲۵ است  $(NO_3-N = 0.225 * NO_3)$ . لذا مقدار نیتروژن با منبع نیترات که به مزرعه اضافه شده است برابر ۵۵/۱۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار است.

اندازه‌گیری نیتروژن-نیتراتی خاک به روش سالسلیک اسید (Vendrell and Zupancic, 1990):

گیاه نیتروژن را به فرم‌های معدنی آمونیم، نیترات و حتی به فرم نیتريت نیز جذب می‌کند. تبدیل آمونیم به نیترات را پروسه نیترات‌سازی نیترات‌سازی<sup>۱</sup> اکسیداسیون آمونیم به نیترات با یک مرحله فرآیند میانی تولید نیتريت است. فرآیند نیترات‌سازی بیشتر به دلیل میکروارگانیسم‌های نیتروسومانس<sup>۲</sup> و نیتروباکتر<sup>۳</sup> یک واکنش اتوتروپیک<sup>۴</sup> است. سرعت نیتریفیکاسیون تحت تاثیر مواد مغذی به کاررفته، دما، pH، هوادهی، رطوبت، مواد آلی و حضور بازدارنده‌ها است. (McLaren, 1976)

پروسه نیترات‌سازی را به فرم ریاضی زیر ارائه کرد:



اعداد ۱، ۲، ۳، ۴ شماره واکنش P، مجموع NO، NO<sub>2</sub> و N<sub>2</sub> تولید شده است. واکنش‌های شماره ۱ و ۲ واکنش از نوع مرتبه اول، در صورتی است که واکنش‌های ۳ و ۴ واکنش‌های برگشتی مرتبه صفر در شرایط بی‌هوازی باشد. با توجه به اینکه سرعت واکنش‌های ۱ و ۲ از سایر واکنش‌ها بیش‌تر است، رابطه بالا نشان می‌دهد که در نهایت در صد غالب نیتروژن موجود در خاک در شرایط استاندارد از نظر رطوبت، دما، pH و... به فرم نیترات در می‌آید (Barber, 1995). بنابراین اندازه‌گیری این پارامتر تا حدودی معرف نیتروژن کل خاک است. لذا برای آگاهی از میزان لازم کود نیتروژنی، بررسی آثار زیست محیطی و آبشویی نیترات اندازه‌گیری آن در خاک اهمیت دارد.

تجهیزات مورد نیاز

۱- املاح و مواد جامد که باعث کدورت نمونه‌های آب

می‌شود به وسیله صافی ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر می‌شود.

۲- ۱ میلی لیتر اسید هیدروکلردیک ۱ مولار به ۵۰

میلی لیتر از نمونه آبهای فیلتر شده در مرحله قبل و نمونه استانداردها اضافه و مخلوط می‌شود.

۳- دستگاه اسپکتروفوتومتر را با محلول‌های استاندارد

در طول موج ۲۲۰ نانومتر کالیبره کرده، سپس نمونه‌ها قرائت می‌شوند. در صورتی که میزان جذب بیشتر از ۱ و یا غلظت بیشتر از ۵۰ میلی گرم برلیتر باشد، نیاز به رقیق سازی است. با استفاده از یک بالن حجمی به نسبت مناسب و معین رقیق سازی به گونه‌ای انجام شود که میزان جذب در محدوده ۰/۹-۰/۱ قرار گیرد همچنین در صورت وجود مواد آلی (مواد آلی بیشتر در پساب‌های خانگی، صنعتی و مزارع وجود دارد) برای حذف تاثیر مواد آلی قرائت‌ها در ۲۷۵ نانومتر نیز انجام شود. سپس میزان جذب توسط رابطه زیر اصلاح می‌گردد:

$$Abs_{adj} = Abs_{220} - (2 \times Abs_{275}) \quad (1)$$

در اینجا Abs<sub>adj</sub> میزان جذب اصلاح شده، Abs<sub>220</sub>

میزان جذب در ۲۲۰ نانومتر و Abs<sub>275</sub> میزان جذب در طول موج ۲۷۵ نانومتر.

باید توجه داشت تنها در صورتی که دو برابر مقدار جذب در طول موج ۲۷۵ نانومتر کمتر از ۱۰٪ جذب در طول موج ۲۲۰ نانومتر باشد، می‌توان از رابطه فوق استفاده کرد و در صورت قابل ملاحظه بودن مواد آلی، نیتريت، شوینده‌ها و کروم از روش دیگری نیترات اندازه‌گیری می‌شود (Rizvanipour, 2014).

تبدیل غلظت نیترات آب آبیاری به کیلوگرم نیترات بر هکتار:

مثال: اگر فرض کنیم غلظت نیترات آب آبیاری ۳۵

میلی گرم بر لیتر باشد و آبیاری در طی فصل رشد به میزان ۷۰۰ میلی متر انجام شده باشد، میزان نیتراتی که از طریق آب آبیاری به هر هکتار از خاک اضافه شده است، به صورت زیر به دست می‌آید. در ابتدا حجم کل آب آبیاری برای هر هکتار محاسبه می‌شود و سپس از حاصل ضرب حجم آب آبیاری در غلظت نیترات در آب آبیاری، میزان

<sup>3</sup> Nitrobacter

<sup>4</sup> autotrophic

<sup>1</sup> Nitrification

<sup>2</sup> Nitrosomonas

داده شود و بعد از سرد شدن محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار گیرد.

۳- سپس ۱۰ سی سی NaOH چهار مولار به محلول های ساخته شده در مرحله قبل اضافه شود و مجدداً ورتکس سریع شود. پس از ۱ ساعت نمونه ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شوند. از نمونه های استاندارد برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده می شود.

**روش تبدیل غلظت نیتروژن-نیتراتی به دست آمده به کیلوگرم نیتروژن-نیتراتی بر هکتار**

حجم نمونه عصاره خاکی که برای تعیین غلظت استفاده شده است، نیم (۰/۵) سی سی است. بنابراین با ضرب غلظت نمونه به دست آمده در ۰/۵، میزان نیتروژن-نیتراتی موجود در نمونه آزمایشی به دست می آید. از آنجاکه برای تهیه عصاره از ۲۰ سی سی محلول خاک استفاده شده است، میزان نیتروژن-نیتراتی در ۲۰ سی سی حجم عصاره ۴۰ برابر مقدار نیتروژن-نیتراتی در نیم سی سی است، این میزان نیتروژن-نیتراتی از ۱۰ گرم نمونه خاک بدست آمده است؛ بنابراین با داشتن وزن یک هکتار خاک (حاصل ضرب وزن مخصوص ظاهری خاک در حجم خاک (pb\*Vt) و برقرای تناسب ساده میزان نیتروژن-نیتراتی در یک هکتار به دست می آید.

مثال: در صورتی که عدد قرائت شده از اسپکتروفوتومتر برای نمونه ای ۱ میلی گرم بر لیتر نیتروژن-نیتراتی باشد و این نمونه از عمق ۰-۲۰ سانتی متری خاک برداشته شده باشد و وزن مخصوص ظاهری خاک ۱۴۰۰ کیلوگرم بر مترمکعب باشد، میزان نیتروژن-نیتراتی موجود در خاک به صورت زیر محاسبه می شود:

باتوجه به اینکه ۰/۵ سی سی از عصاره اشباع خاک برای اندازه گیری نیترات استفاده کردیم؛ بنابراین داریم

$$0.5 \text{ cc} \times \frac{1 \text{ mgr}}{1000 \text{ cc}} = 0.0005 \text{ mgr. (N-NO}_3\text{)} \quad (4)$$

۰/۵ سی سی عصاره خاک ۰/۰۰۰۵ میلی گرم نیتروژن-نیتراتی دارد؛ لذا نیتروژن-نیتراتی ۲۰ سی سی عصاره برابر است با:

$$0.0005 \times 40 = 0.02 \text{ mgr. (N-NO}_3\text{)} \quad (5)$$

۲۰ سی سی عصاره خاک از ۱۰ گرم نمونه خاک الک شده به دست آمده است؛ لذا برای ۱ هکتار خاک تا عمق

-اسپکتروفوتومتر دارای طول موج ۴۱۰ نانومتر  
-سل نگهداری نمونه در اسپکتروفوتومتر (کوارتزی)

#### مواد شیمیایی مورد نیاز

۱- سولفات پتاسیم نیم مولار: ۸۷/۱۳ گرم ( $K_2SO_4$ )  
سولفات پتاسیم به حجم ۱ لیتر رسانده شود (روی هیتر مغناطیسی) توصیه می شود این محلول روزانه ساخته شود.  
۲- سود ۴ مولار: ۱۶۰ گرم NaOH به حجم ۱ لیتر رسانده شود (کمکم آب اضافه شود؛ چون دما سریع بالا می رود) توصیه می شود این محلول روزانه ساخته شود.  
۳- اسید سالیسیلیک ۵٪: ۵ گرم اسید سالیسیلیک و ۹۵ سی سی اسید سولفوریک غلیظ باهم مخلوط شوند (خیلی با احتیاط) این محلول تا یک هفته در ظرف شیشه ای تیره و داخل یخچال قابل نگهداری است.

۴- محلول نیترات پتاسیم: ۷/۲۳ گرم  $KNO_3$  در یک لیتر آب حل شود (نیترات پتاسیم ۲ ساعت قبل از آزمایش در آون و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد خشک شود). از این محلول ۲۵ سی سی برداشته شود و با آب به حجم ۵۰۰ سی سی برسد تا محلول ۱۰۰۰ ppm نیتروژن-نیتراتی به دست آید. توصیه می شود این محلول روزانه ساخته شود.  
۵- استاندارد ها: ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۲۰ سی سی از محلول نهایی  $KNO_3$  مرحله قبل برداشته و در بالن ۵۰ سی سی ریخته شود و با محلول  $K_2SO_4$  به حجم ۵۰ سی سی برسد. بنابراین غلظت نیتروژن-نیتراتی در هر یک از نمونه استاندارد ها به ترتیب ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر به دست می آید. از این استاندارد ها برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده می شود.

#### ۲-۲-۳ روش انجام آزمایش

۱- نمونه خاک ها: مقداری از خاک هوا خشک شده از الک ۲ میلی متری عبور داده می شود. در این مرحله در صد سنگ ریزه نمونه خاک نیز محاسبه شود. سپس ۱۰ گرم نمونه خاک عبور کرده از الک به علاوه ۲۰ سی سی  $K_2SO_4$  نیم مولار ۳۰ دقیقه در شیکر قرار داده و سپس محلول با کاغذ واتمن صاف می شود.

۲- ۰/۵ سی سی از استاندارد هایی که در مرحله قبل ساخته شدند و همچنین از محلول عصاره خاک ها هم ۰/۵ سی سی برداشته، ۱ سی سی محلول ۵٪ اسید سالیسیلیک به آن اضافه شود. محلول حاصل در ورتکس سریع قرار

۲۰ سانتی متر داریم:

10 gr نمونه خاک الک شده	0.02mg(N-NO <sub>3</sub> )
(وزن یک هکتار خاک تا عمق ۲۰ سانتی متر، بر حسب گرم)	X=?
1400×0.2×1000×10000	

$$X = 5600000 \text{ mg (N-NO}_3\text{)}/\text{ha} = 5.6 \text{ kg (N-NO}_3\text{)}/\text{ha} = 24.8 \text{ kg /ha (NO}_3\text{)} \quad (6)$$

نکته حائز اهمیت این است که از آنجایی که خاک مورد آزمایش بدون سنگ‌ریزه بود، برای خاک واقعی درصد سنگ‌ریزه نیز در نظر گرفته می‌شود. اگر فرض شود درصد سنگ‌ریزه خاک ۳۰ در صد باشد، میزان نیترات واقعی در هر هکتار برابر است با:

$$X = 24.8 \times 0.7 = 17.36 \text{ kg /ha (NO}_3\text{)} \quad (7)$$

**اندازه‌گیری نیترات گیاه با روش سولفوسالسیلیک اسید (Singh, 1988):**

مقدار نیترات در علوفه و گیاهان چمنی گاهی می‌تواند آنقدر زیاد شود که برای دام‌ها به خصوص دام‌های نشخوارکننده مضر باشد. زیادی نیترات در دام‌ها باعث سقط جنین و کاهش میزان تولید شیر شده، در حالت شدید منجر به مرگ می‌گردد. بیماری مت هموگلوبینمی در گاو نیز وجود دارد و نیترات در معده گوسفند و گاو احیا شده و تولید یون نیتريت می‌کند. علوفه مرطوب نیز می‌تواند تولید نیتريت کند. نیتريت، ابتدا جذب شده و سپس وارد خون می‌شود و در آنجا اکسی هموگلوبین را تبدیل به متوگلوبین می‌کند و باعث اختلالاتی در بدن دام می‌شود (Malkoti, 1994).

کمیته علوم غذایی اروپا (۱۹۹۵)، مقدار جذب قابل قبول نیترات را ۳/۶۵ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن معادل ۲۱۹ میلی گرم در روز برای یک فرد ۶۰ کیلوگرمی تعیین کرده است (Craun et al., 1981). بنابراین تعیین میزان نیترات محصولات گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

#### تجهیزات مورد نیاز

- اسپکتروفوتومتر دارای طول موج ۴۱۰ نانومتر

- سل نگهداری نمونه در اسپکتروفوتومتر (کوارتری)

- حمام آب (بن‌ماری)

- سانتیفریوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه

#### مواد شیمیایی مورد نیاز

۱- محلول استاندارد مادر (۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر): ۶۳۰۶ گرم از نمک جامد نیترات پتاسیم که قبلاً در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس آون خشک شده است به حجم ۱۰۰۰ سی سی رسانده شود.

۲- محلول‌های استاندارد: ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۱۳۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر نیترات با رقیق سازی محلول استاندارد مادر مرحله قبل تهیه شود. برای این کار به ترتیب ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۳، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ سی سی از محلول استاندارد مرحله قبل برداشته و به حجم ۱۰۰ سی سی رسانده شود.

۳- سولفوسالسیلیک ۵٪: ۵ گرم سولفوسالسیلیک در ۹۵ سی سی اسید سولفوریک حل شود.

#### روش انجام آزمایش

۱- ۱/۰ گرم نمونه گیاهی که در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شده، پودر و با الک شماره ۴۰ (۴۲۰ میکرومتر) الک شده و با دقت وزن شود.

۲- ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شود و به مدت یک ساعت در دمای ۴۵ درجه سلسیوس در بن‌ماری نگهداری شود.

۳- سپس نمونه‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شوند.

۴- ۲/۰ میلی گرم از هریک از محلول‌های استاندارد و محلول‌های گیاهی به دست آمده در مرحله قبل برداشته و داخل لوله‌های آزمایش ریخته شود. سپس ۰/۸ سی سی اسید سولفوسالسیلیک ۵٪ به آن اضافه شده و محلول حاصل با استفاده از ورتکس سریع کاملاً مخلوط شود.

۵- بعد از سرد شدن محلول‌های مرحله قبل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط ۱۹ میلی لیتر سود دو نرمال به آنها اضافه گردد و مجدد ورتکس سریع شود. بعد از یک ساعت با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۱۰ قرائت انجام شوند. از نمونه‌های استاندارد برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده می‌شود.

**تبدیل غلظت نیترات نمونه گیاهی به کیلوگرم نیترات بر هر تن محصول:**

مثال: اگر فرض کنیم غلظت نیترات قرائت شده از دستگاه برای گیاهی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر باشد، میزان نیترات موجود در یک تن از این محصول به صورت زیر

به دست می آید.

از آنجا که عدد قرائت شده برای ۰/۲ سی سی از محلول عصاره گیاه است، در نتیجه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میزان نیترات موجود در آن:

$$0.2cc \times \frac{100mgr}{1000cc} = 0.02 mgr (NO_3) \quad (8)$$

حجم کل نمونه عصاره گیاه ۱۰ سی سی است در نتیجه میزان نیترات آن برابر است با:

$$0.02 mgr. NO_3 \times 50 = 1 mgr (NO_3) \quad (9)$$

۱۰ سی سی عصاره گیاه از ۰/۱ گرم نمونه به دست آمده است؛ لذا برای یک تن از محصول مورد نظر داریم:

0.1 gr نمونه گیاه	1 mgr. NO <sub>3</sub>
-------------------	------------------------

$$X = 10,000,000 mgr. (NO_3)/Ton = 10kg (NO_3)/Ton \quad (10)$$

باتوجه به نتیجه به دست آمده می توان نتیجه گرفت برای تبدیل عدد قرائت شده دستگاه به واحد کیلوگرم بر تن باید عدد دستگاه بر ۱۰ تقسیم شود.

#### نتایج و بحث

باتوجه به تجربیات کسب شده درخصوص آزمایشهای به روش اسپکتروفوتومتر برای افزایش دقت، باید به نکات زیر توجه شود:

۱- اندازه گیری نیترات آب ساده تر و دقیق تر و نیترات خاک به دلیل وجود مواد آلی، آمونیوم و سایر املاح و عناصر خاک مشکل ترین است.

۲- در روش های رنگ سنجی به دست آمدن یک عصاره زلال و بی رنگ ضروری است؛ بنابراین باید در تهیه عصاره گیاه و خصوصاً خاک دقت لازم صورت گیرد و از صافی های مناسب استفاده شود. و در صورتی که عصاره شفاف نبود مجدد توسط صافی فیلتر گردد.

۳- آزمایش نیترات خاک و گیاه به شدت به کیفیت مواد شیمیایی، به خصوص کیفیت اسید سولفوریک وابسته است؛ بنابراین سعی شود بهترین کیفیت اسید سولفوریک تهیه و استفاده شود.

۴- دقت در توزین نمونه ها اهمیت زیادی دارد، مخصوصاً وزن های خیلی کم و برداشت نمونه مثل ۱/۱۰ گرم وزن گیاه یا ۰/۲ سی سی از محلول گیاه، در صورتی که کوچکترین خطایی وجود داشته باشد مستقیم بر روی نتایج اثر می گذارد. توصیه می شود از وسایل آزمایشگاهی مناسب و دقیق استفاده شود. جابه جایی هوا به وسیله لباس و یا پنجره باز روی دقت توزین موثر است.

۵- به دلیل وابستگی شدید این روش به کیفیت مواد آزمایشگاهی توصیه می شود اگر چندین سری نمونه آزمایشگاهی در دستور کار قرار دارد، مثلاً از مراحل مختلف رشد گیاه یا تکرارهای مختلف یک تیمار، نمونه ها به صورت مختلط مورد آزمایش قرار گیرد. در هر سری آزمایش فقط نمونه های یک تیمار آزمایش نشود، زیرا اگر در یک سری از آزمایشات به هر دلیلی اگر خطا رخ دهد قابل تشخیص نیست.

#### نتیجه گیری

باتوجه به روش های ارائه شده در این پژوهش می توان میزان نیتروژن- نیتراتی را در هریک از محیط های آب خاک و گیاه را به صورت واحدهای کاربردی در مزرعه به دست آورد که هم در ارزیابی ها و تحلیل های اقتصادی و زیست محیطی می توان از آن استفاده کرد و هم برای کشاورزان قابل درک است. همچنین خود روش طیفسنجی نیز در مقایسه با سایر روش ها به دلیل (۱) ارزان قیمت بودن، (۲) حساسیت خوب آن برای عناصر مختلف، (۳) ساده بودن دستگاه و سادگی کار با آن، (۴) صحت، تکرارپذیری خوب، (۵) سرعت بالا، (۶) حذف مواد شیمیایی سرطانزا و (۷) به دلیل عدم نیاز به مواد شیمیایی خاص در زمان آزمایش، نسبت به سایر روش ها خصوصاً زمانی که تعداد نمونه ها زیاد است بسیار مناسب و اقتصادی است.



## منابع

- Akbari Asrami O., Bohluly A., Aliakbari Bidokhti A.A. 2021. Estimation of contribution of nitrate pollution sources on the spatial distribution of the pollutant in the Caspian Sea. *Iranian Journal of Geophysics* 15(3), pp.167-189 (In Persian).
- Ata-Ul-Karim S.T., Yao X., Liu X., Cao W., Zhu Y. 2014. Determination of critical nitrogen dilution curve based on stem dry matter in rice. *PLoS One* 9, e104540.
- Barber S.A. 1995. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. John Wiley and Sons.
- Bulgariu L., Bulgariu D. 2012. Direct determination of nitrate in small volumes of natural surface waters using a simple spectrophotometric method. *Reviews in Analytical Chemistry* 31(3-4), pp.201-207.
- Chandna P., Khurana M., Ladha J.K., Punia M., Mehla R., Gupta R. 2011. Spatial and seasonal distribution of nitrate-N in groundwater beneath the rice-wheat cropping system of India: a geospatial analysis. *Environmental monitoring and assessment* 178, pp.545-562.
- Craun G.F., Greathouse D.G., Gunderson D.H. 1981. Methaemoglobin levels in young children consuming high nitrate well water in the United States. *International journal of epidemiology* 10(4), pp.309-317.
- Eickhout B., Bouwman A.v., Van Zeijts H. 2006. The role of nitrogen in world food production and environmental sustainability. *Agriculture, ecosystems and environment* 116(1-2), pp. 4-14.
- García-Robledo E., Corzo A., Papaspyrou, S. 2014. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Marine Chemistry* 162, pp.30-36.
- Kaiser J. 2001. The other global pollutant: nitrogen proves tough to curb. *American Association for the Advancement of Science*.
- Karrat A., Digua K., Amine, A. 2022. Development of a simplified spectrophotometric method for nitrite determination in water samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 267, 120574.
- Malkoti M., Nafisi M. 1994. Fertilizer consumption in agricultural lands. *Tarbiat Modares University*. (In Persian)
- Moosavinasab Z., Gholamzadeh F. 2021. Investigation of Nitrate Contamination in Groundwater, Soil, and Crops (Case Study: Fasa Plain). *Sustainability ,Development & Environment* 2(4-8), pp.19-34. (In Persian)
- Manassaram D.M., Backer L.C., Messing R., Fleming L.E., Luke B., Monteilh C.P. 2010. Nitrates in drinking water and methemoglobin levels in pregnancy: a longitudinal study. *Environmental Health* 9, pp.1-12.
- McLaren A.D. 1976. Comments on nitrate reduction in unsaturated soil. *Soil Science Society of America Journal* 40(5), pp.698-699.
- Rizvanipour H., Dinani Z. 2014. Chemical analysis of water and soil from an environmental and health point of view. *Isfahan University of Technology Jihad Publications*. (In Persian)
- Self J.R., Waskom R. 2008. Nitrates in drinking water. *Service in action*; no. 0.517.
- Seilsepour M. 2022. Study of concentrations of nitrates and heavy metals in soil and lettuce and risk assessment of its consumption. *Journal of Crops Improvement*. (In Persian)
- Sepaskhah A. 2010. Organic agriculture and water and fertilizer efficiency. *Organic Agriculture Conference*. Academy of Sciences (Tehran). (In Persian)
- Shokrian F., Sabbaq A., Saberi A. 2021. Assessment of Nitrate Pollution of Groundwater Resources in Sari Plain. *Degradation and Rehabilitation of Natural Land* 1(2), pp.45-58 (In Persian).
- Singh J. 1988. A rapid method for determination of nitrate in soil and plant extracts. *Plant and soil* 110, pp.137-139.
- Stephan C.E., Mount D.I., Hansen D.J., Gentile J., Chapman G.A., Brungs W.A. 1985. Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses. *US Environmental Protection Agency Washington, DC*.
- Vendrell P.F., Zupancic J. 1990. Determination of soil nitrate by transnitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 21(13-16), pp.1705-1713.
- Ward M.H., DeKok T.M., Levallois P., Brender J., Gulis G., Nolan B.T., VanDerslice J. 2005. Workgroup report: drinking-water nitrate and health—recent findings and research needs. *Environmental health perspectives* 113, pp.1607-1614.
- Weyer P.J., Cerhan J.R., Kross B.C., Hallberg G.R., Kantamneni J., Breuer G., Jones M.P., Zheng W., Lynch C.F. 2001. Municipal drinking water nitrate level and cancer risk in older women: the Iowa Women's Health Study. *Epidemiology*, pp.327-338.
- Wolff I., Wasserman A. 1972. Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines: Extensive research is needed to establish how great a food hazard these nitrogenous substances present. *Science* 177, pp.15-19.
- Wu J., Hong Y., Guan F., Wang Y., Tan Y., Yue W., Wu M., Bin L., Wang J., Wen J. 2016. A rapid and high-throughput microplate spectrophotometric method for field measurement of nitrate in seawater and freshwater. *Scientific reports* 6, pp.1-9.