بررسی پتانسیل کاربرد نانو ذره نانوپروسیل-1(lus-1) به عنوان حامل باکتری حل کننده فسفات در فرایند تولید زادمایه نانوبیولوژیک

شایان شریعتی، حسینعلی علیخانی[1] و احمدعلی پوربابائی

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه تهران؛ **shayan_shariati@ut.ac.ir**

دانشیار دانشگاه تهران؛ **halikhan@ut.ac.ir**

استادیار دانشگاه تهران؛ **pourbabaei@ut.ac.ir**

دریافت: **91/11/23** و پذیرش **92/10/24**

چکیده

هدف پژوهش حاضر بررسی توانایی ماندگاری باکتری *سودوموناس فلورسنس* به عنوان یکی از باکتری‌های حل کننده فسفات بر روی نانوپروسیل-1(lus-1، نانوذرات سیلیسی) به عنوان حامل باکتری در تولید زادمایه نانوبیولوژیک بود. تیمارهای حامل مورد بررسی شامل: نانوپروسیل-1، ورمی‌کمپوست، بنتونیت، خاک فسفات، و فرمولاسیون‌های متفاوت از این مواد بود. بعد از تلقیح مواد حامل با باکتری *سودوموناس فلورسنس* زادمایه‌ها ابتدا به مدت 15 روز در انکوباسیون (دمای 28 درجه سانتیگراد) و سپس در دمای 4 درجه سانتیگراد به مدت 180 روز نگهداری شدند. جمعیت باکتری‌ها به روش کشت مستقیم در پلیت بر حسب $CFU\ g^{-1}$ در زمان های 0، 15، 30، 60، 90 ، 120 ،150 و 180 روز شمارش شد. نتایج پس از 15 روز انکوباسیون نشان دهنده کاهش تعداد باکتری به جزء تیمار حامل ورمی کمپوست بود. به طوری که کمترین جمعیت را تیمار نانوپروسیل-1 به تنهایی و تیمار ترکیبی (نانوپروسیل-1+ بنتونیت+ خاک فسفات) با جمعیت صفر و بیشترین جمعیت را تیمار ورمی‌کمپوست با جمعیت $7/77\times10^7$ دارا بودند. در پایان دوره نگهداری، جمعیت تیمارهای ترکیبی حاوی نانوذره lus-1 (نانوپروسیل-1+ ورمی‌کمپوست+ بنتونیت و نانوپروسیل-1+ ورمی‌کمپوست+ بنتونیت+ خاک فسفات) نسبت به ورمی‌کمپوست با جمعیت ($2/42\times10^7$) نسبتاً فزونی یافته و به ترتیب با $6/45\times10^7$ و $4/19\times10^7$ بیشترین جمعیت را دارا بودند. نتایج این پژوهش نشان داد، استفاده از نانوپروسیل-1 به تنهایی احتمالاً بدلیل pH و قابلیت هدایت الکتریکی بالا و موارد ناشناخته دیگر برای کاربرد به عنوان حامل باکتری مناسب نیست، ولی استفاده از این حامل به صورت مخلوط با حامل‌های دیگر به دلیل اثر تعدیل کنندگی سایر مواد، به عنوان حامل باکتری می‌تواند پیشرفتی نو در تولید زادمایه‌های نانو بیولوژیک باشد.

واژه های کلیدی: بنتونیت، خاک فسفات، *سودوموناس فلورسنس*، نانوذره، ورمی کمپوست

مقدمه

مصرف زیاد کودهای شیمیایی بویژه کودهای نیتروژنه و فسفاته، در سال‌های اخیر منابع آبی جهان را تحت تأثیر قرار داده و موجب بروز مشکلاتی در بخش کشاورزی، محیط زیست، صنعت و بهداشت شده است (لیو و همکاران، 2006). با توجه به گسترش روزافزون نیازهای جهانی به مواد غذایی و محدودیت‌های

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران-دانشکده فناوری کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

بهره‌برداری از اراضی، به ناچار افزایش تولید در واحد سطح امری اجتناب ناپذیر خواهد بود. در این راه استفاده بیشتر از کودهای شیمیایی، از جمله ابزارهای دستیابی در این افزایش تولید است (علی میرزا و همکاران، 1386). مینارد و همکاران (2005) بیان کردند تا سال 2020 هنوز بیش از 70 درصد عملکرد محصولات در سراسر دنیا وابسته به مصرف کودهای شیمیایی خواهد بود. مصرف بهینه کودهای شیمیایی از جمله عوامل موفقیت برنامه‌های تولید محصول از لحاظ کمی و کیفی می‌باشد. با توجه به موارد ذکر شده، آشکار است که تنها راه کاهش عواقب زیست محیطی ناشی از مصرف این کودها، افزایش راندمان مصرف آنها می‌باشد. در این راستا، استفاده از نانوکودها می‌تواند یکی از ساده‌ترین شیوه‌ها به منظور کاهش هدر رفت عناصر غذایی و افزایش کارایی مصرف کودهای شیمیایی باشد (هابکینز و الزورت، 2005). در حقیقت با بهره‌گیری از فن آوری نانو در طراحی و ساخت نانوکودها، فرصت‌های جدیدی به منظور افزایش راندمان مصرف عناصر غذایی و به حداقل رساندن هزینه‌های حفاظت از محیط زیست ایجاد شده است (لیو و همکاران، 2006). بطورکلی مزایای استفاده از نانوکودهای شیمیایی در مقایسه با کودهای مرسوم عبارتند از: (1) افزایش راندمان به واسطه عدم اتلاف کودها توسط آبشویی و جذب کامل کود توسط گیاه به دلیل سرعت مطلوب رهاسازی عناصر غذایی کود (2) کاهش قابل توجه آلودگی خاک، ذخایر آبی و محصولات غذایی (3) افزایش عملکرد محصول به واسطه وضعیت تغذیه‌ای مطلوب گیاه (کیو و همکاران، 2006). این کودها عناصر غذایی و مواد در بردارنده خود را بصورت آهسته و پیوسته رها می‌کنند و لذا بکارگیری آنها در مقایسه با کودهای شیمیایی مرسومی که احتیاج به کاربرد چندباره در طول یک فصل رشد دارند، باعث صرفه جویی در هزینه‌های ناشی از کاربرد و پخش کود درسطح مزرعه می‌شود (شاویو و همکاران، 2005). در تحقیقی که دی رزا و همکاران (2010) انجام دادند نشان داد، که نانوذرات سیلیکاتی جذب شده توسط ریشه گیاه، لایه‌ای را در دیواره‌های سلولی تشکیل می‌دهند که می‌تواند باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش‌های محیطی شده و در نتیجه عملکرد محصول را بهبود بخشد. در خصوص تأثیر نانو ذرات بر روی بقاء و رشد باکتری‌ها، بررسی‌هایی که جی و همکاران (2011) انجام دادند نشان داد که نانو ذرات روی و تیتانیوم باعث کاهش جمعیت باکتری‌ها می‌شود و اثر نانو ذرات روی بر این کاهش جمعیت از نانوذرات تیتانیوم بیشتر است. همچنین تحقیقات لی یونگ و همکاران (2009) نشان داد که استفاده از نانوذرات نقره باعث کاهش جمعیت باکتری‌های *اشرشیا کولای* و *انترادیس* در حدود صفر شد. موراتا و همکاران (2005) بیان کردند که نانو ذره نقره با تأثیر بر روی فعالیت آنزیم دهیدروژنار مانع رشد باکتری می‌شود. ناوارو و همکاران (2008) بیان کردند نانو ذره C_{60} از طریق جذب ویتامین‌ها و مواد مغذی معدنی موجود در خاک رشد باکتری را محدود می‌کند. سایز و همکاران (2005) بیان کردند نانو ذره C_{60} باعث اختلال در لیپیدهای غشایی و DNA می‌شود. در مقابل تونگ و همکاران (2007) بیان نمودند که نانوذره C_{60} Fullerenes تأثیری روی رشد باکتری‌ها ندارد. مطالعات کمی بر روی فعالیت‌های آنتی باکتریایی SiO_2 انجام شده است. لی یانگ و همکاران (2004) نشان دادند که نانو ذرات SiO_2 اثری در رشد باکتری‌ها ندارد ولی بررسی که لائورا و همکاران (2006) بر روی تأثیر نانو ذرات TiO_2, SiO_2 و ZnO_2 بر روی باکتری‌های *E.coli* و *B.subtilis* انجام دادند نشان داد که نانو ذره TiO_2 بیشترین سمیت و نانو ذره SiO_2 کمترین سمیت را داشتند. البته سمیت نانوذره SiO_2 در غلظت‌های خیلی بالا در حد 5000 میلی‌گرم در لیتر رخ داد و اثر این سمیت بر روی باکتری گرم مثبت *B.subtilis* بیشتر بود. طی بررسی که هولاندا و همکاران (2011) انجام دادند مشاهده شده که نانوذره سیلیکاته SBA-15,SBA-16,SBA-15/p تأثیری منفی بر روی رشد باکتری *Neisseria meningitides* نداشت. طبق بررسی به عمل آمده تاکنون مطالب زیادی به عنوان نقش نانوذرات به عنوان حامل و نگهدارنده باکتری‌ها به چاپ نرسیده است. بنابراین با توجه به گستردگی، سودمندی و پتانسیل بالای نانو مواد در بخش‌های مختلف و سمیت کم نانو ذرات سیلیسی بر روی باکتری‌ها، هدف از این پژوهش بررسی پتانسیل نانوذره نانوپروسیل-1 (lus-1) به طور مجزا و ترکیب با سایر مواد (ورمی‌کمپوست، خاک فسفات و بنتونیت) به عنوان حامل باکتری بود. نانوپروسیل - 1 نوعی سیلیکات با آرایش هگزاگونال یک بعدی است که در آن استحکام بالاتری نسبت به سایر مزوپورهای سیلیکاتی مشاهده می‌شود.

مواد و روش ها

تهیه مواد حامل

در این آزمایش از چهار ماده شامل: نانوپروسیل-1، ورمی‌کمپوست، خاک فسفات، بنتونیت و ترکیبی از آنها مطابق جدول 1 به عنوان حامل استفاده گردید. نانو ذره سیلیکاته متخلخل (lus-1) ازگروه شیمی معدنی دانشگاه تهران تهیه گردید، که به صورت اختراع در سال 2001 در دانشگاه تهران و دانشگاه لاوال کانادا

ثبت شده است (بنویت 2001)، که فرم هیدروفیل آن مورد استفاده قرار گرفت. ورمی‌کمپوست از مزرعه تحقیقاتی پردیس و کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، خاک فسفات پودری از موسسه تحقیقات خاک و آب کرج و بنتونیت سدیمی نیز از شرکت آذرخش تهیه گردید.

اندازه‌گیری خصوصیات مواد حامل

مواد مذکور ابتدا پودر و از الک 60 مش عبور داده شدند و سپس در آون خشک گردیدند. برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی این مواد مانند رطوبت FC، pH، EC، سدیم و پتاسیم محلول (اسپارکس، 1996)، فسفر قابل جذب به روش اولسن (کارتر و گرگوریچ، 2008)، ماده آلی به روش والکی و بلک (کارتر و گرگوریچ، 2008)، عناصر مس، آهن، روی و منگنز قابل جذب بوسیله دستگاه جذب اتمی مدل Shimadzu AA670 اندازه‌گیری شد (لینزی و نورول، 1987).

اندازه‌گیری سطح ویژه[1](BET) و تخلخل مواد حامل

اندازه‌گیری سطح ویژه و تخلخل نانوپروسیل-1، ورمی-کمپوست، خاک فسفات و بنتونیت بوسیله دستگاه BEL sorp-mini در پژوهشگاه مواد و انرژی کرج اندازه‌گیری شد و سطح ویژه تیمارهای متفاوت این مواد نیز بطور تخمینی محاسبه گردید (پنل، 2002).

آماده‌سازی حامل‌ها و تکثیر باکتری

برای استریل کردن حامل‌ها مقدار 50 گرم از نانوپروسیل-1، بنتونیت و خاک فسفات خشک شده سپس به مدت نیم ساعت در اتوکلاو در دمای 121 درجه سانتیگراد و فشار 1/34 اتمسفر نگهداری شدند (پزنتی و همکاران، 1991). به منظور خشک کردن، مواد مذکور به مدت 3 ساعت در دمای 70 درجه سانتیگراد در داخل آون (از قبل استریل شده با دمای 200 درجه سانتیگراد) قرار داده شدند. همچنین سترون سازی ورمی‌کمپوست نیز به روش استریل کردن با بخار (steam sterilization) و به مدت یک ساعت (طی دو نوبت) انجام گردید (استریدوم و رزنبرگ،1981). سپس در شرایط استریل، ترکیب‌های متفاوتی از این مواد مطابق جدول یک تهیه گردید. در مرحله بعد حامل‌ها به کیسه های پلی اتیلنی استریل شده اضافه گردید و درب آنها دوخته شد.

برای تهیه سوسپانسیون باکتری *سودوموناس فلورسنس*، ابتدا یک لیتر از کشت 16 ساعته از این باکتری در محیط کشت نوترینت براث (NA) تهیه گردید و سپس به میزان 5 درصد به محیط تازه نوترینت براث به منظور بدست آوردن جمعیت کافی تلقیح شد و به مدت 48 ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای 28 درجه سانتیگراد و چرخش 100 دور در دقیقه گرماگذاری شد. با توجه به منحنی رشد باکتری، پس از رشد کافی و رسیدن به مرحله رشد ثابت (حدود 48 ساعت) به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Unico 1100 در طول موج600 نانومتر میزان OD قرائت گردید و با استفاده از روش کدورت سنجی (Turbidimetry) و جدول استانداردهای مک فارلند (Mc Farland) جمعیت سوسپانسیون، 10^9باکتری به ازای هر میلی‌لیتر تخمین زده شد (سوماسگاران و هوبن، 1994). سوسپانسیون کشت تازه باکتری با توجه به رطوبت FC مواد حامل (جدول شماره 1)، به هر بسته (50 گرمی) اضافه گردید و درب آنها دوخته شد. دلیل استفاده از رطوبت FC به لحاظ رطوبت مناسب، طبق بررسی‌های گریفیت و راگلی (1992) و نیز مشهدی و همکاران (1383) بود که رطوبت مناسب برای نگهداری باکتری را 30- کیلوپاسکال بیان کردند. سپس برای توزیع یکنواخت باکتری بر روی مواد حامل هر بسته به خوبی بهم زده شد. آنگاه بسته‌های مواد حامل به منظور رشد باکتری‌ها به مدت 15 روز در انکوباتور و دمای 28 درجه نگهداری شدند، سپس تا پایان 180 روز در یخچال در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شدند (مشهدی و همکاران، 1383).

بررسی جمعیت باکتری در تیمارهای حامل

شمارش باکتری به روش $CFU\ g^{-1}$ در زمان‌های 0، 15، 30، 45، 60، 90، 120، 150و 180 روز با سه تکرار انجام گرفت، بدین صورت که یک گرم از حامل-های داخل بسته‌ها در شرایط استریل برداشته شد و سری-های رقت تهیه گردید. سپس سوسپانسیون‌های حاصل روی محیط نوترینت آگار کشت شدند و بعد از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 28 درجه سانتیگراد پلیت-هایی که حاوی حدود300-3 کلنی بودند شمارش شده و با مقایسه با پلیت شاهد منفی (بدون کشت) و پلیت شاهد مثبت (کشت خالص باکتری *سودوموناس فلورسنس*)، جمعیت باکتری در هر تیمار تعیین گردید (کالجیت و همکاران، 2011). آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با 3 تکرار اجرا گردید. نتایج حاصل از شمارش باکتری با نرم افزار SAS 9.2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین تیمارها با استفاده از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد محاسبه شدند.

نتایج و بحث

هدف این تحقیق بررسی پتانسیل ماندگاری باکتری بر روی نانوذره سیلیسی نانوپروسیل-1 و تیمار

[1] Brunauer-Emmertt-Teller

ترکیبی حاوی نانوذره مذکور در راستای تولید زادمایه نانو بیولوژیک بود و اینکه آیا این ماده با توجه به خصوصیاتی که دارد به تنهایی و یا به صورت ترکیب با سایر مواد، توان نگهداری باکتری را دارد، بررسی شد. همانطور که در جدول شماره دو ملاحظه می‌شود، خصوصیات متفاوت مواد حامل از لحاظ درصد کربن آلی، رطوبت FC و فسفر قابل جذب، باعث شد که فرمولاسیون متفاوتی از این مواد نیز به عنوان یک تیمار حامل مورد استفاده قرار گیرد.

جدول 5 نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف زمان و ماده حامل بر جمعیت باکتری‌ها در 7 حامل را نشان می‌دهد. اثر اصلی و اثر متقابل تیمارها بر جمعیت باکتری در سطح 1 درصد معنی‌دار تشخیص داده شد.

همانطور که در شکل 1- الف و 1- ب ملاحظه می‌شود بعد از 15 روز انکوباسیون جمعیت باکتری‌ها در حامل‌های شماره 1و 5 به ترتیب نانوپروسیل-1، تیمار مخلوط (نانوپروسیل-1+ بنتونیت+ خاک فسفات) به شدت کاهش یافته و رشد باکتری بر روی پلیت‌ها مشاهده نشد. این امر در حالی است که با توجه به شکل های 1- پ و 1- ت جمعیت باکتری‌ها در تیمارهای مخلوط 6 و 7 به ترتیب (نانوپروسیل-1+ بنتونیت+ خاک فسفات+ ورمی‌کمپوست) و (نانوپروسیل-1+ بنتونیت+ ورمی-کمپوست) بیشتر از 10^7 باکتری به ازای هر گرم ماده حامل بود. دلیل افت شدید جمعیت در حامل‌های شماره 1 و 5 ممکن است به دلیل pH و EC بالا این نانوذره و فقدان ماده غذایی کافی در شرایط نگهداری باشد. دلیل دیگر کاهش جمعیت را شاید به‌توان به دلیل هتروتروف بودن باکتری *سودوموناس فلورسنس* و کمبود مواد آلی در این مواد دانست، زیرا هنگامی که باکتری‌ها در شرایط رشد (15 روز انکوباسون) قرار بگیرند در فاز رشد لگاریتمی افزایش نسبی یافته و البته احتمالاً پس از اتمام مواد غذایی (ماده آلی)، دچار کمبود شده و این امر باعث کاهش جمعیت باکتری شده است، و همچنین فرایند خشک شدن (desiccation) و تولید مواد سمی در این دما نیز می‌توانند از دلایل این کاهش باشند (سیگدم و مری، 2005). دیرمون و همکاران (1962) بیان کردند دمای 28 درجه سانتیگراد اگرچه باعث رشد و افزایش جمعیت باکتری‌ها می‌شود، ولی باعث تولید مواد زائد شده که این مواد زائد علاوه بر سمی بودن برای باکتری سبب تغییر pH شده و منجر به مرگ باکتری می‌شود. از سوی دیگر دلیل انتخاب دوره انکوباسیون طبق بررسی‌هایی بود که کالجیت و همکاران (2011) انجام دادند که در آن تعداد باکتری در حامل پیت که یک حامل با ظرفیت نگهداری رطوبت مناسب و ماده آلی فراوان است، در دمای 28 درجه سانتیگراد بیشتر از 4 درجه سانتیگراد بود، همچنین مندز و ویدیرا (2005) بیان می‌کنند، 41 روز نگهداری باکتری‌ها در دمای 28 درجه سانتیگراد موجب افزایش تعداد سلول‌های زنده باکتری در همه حامل‌ها شده و به حدود 10^9 باکتری به ازای هر گرم از حامل رسید.

در پایان 6 ماه نگهداری، حامل‌های شماره 7، 6 و 2 به ترتیب با لگاریتم جمعیت 7/809، 7/622 و 7/383 و حامل‌های شماره 4 و 3 به ترتیب با لگاریتم جمعیت 5/92 و 5/739 بیشترین و کمترین جمعیت را دارا بودند. همان‌طور که در شکل شماره 2 دیده می‌شود مقایسه میانگین بین حامل‌ها در سطح 5 درصد معنی‌دار شد و نشان داد که حامل‌های شماره 7 (نانوپروسیل-1 + ورمی-کمپوست+ بنتونیت) بهترین و حامل‌های شماره 1 و 5 ضعیف‌ترین بوده‌اند. همچنین تفاوت معنی‌داری بین حامل‌های شماره 6 (نانوپروسیل-1 + ورمی‌کمپوست+ بنتونیت+ خاک فسفات) و حامل شماره 2 (ورمی-کمپوست) مشاهده نشد. بررسی که برار و همکاران (2010) انجام دادند مشخص نمود که به دلیل جذب سطحی نانو ذرات بوسیله ماده آلی تحرک نانوذرات نانوپروسیل کاهش یافته و بنابراین تأثیر آنها روی فعالیت-های میکروبی کاهش چشمگیری داشت. دمیسی و همکاران (2010) بیان کردند برهم‌کنش بین مواد نانو و مواد آلی می‌تواند تأثیر قابل توجهی روی هدر رفت، انتقال و درسترسی زیستی مواد نانو بگذارد. کیو و همکاران (2010) بیان کردند که هیومیک اسید روی سرعت تجمع C_{60} تأثیر می‌گذارد. شیه و همکاران (2010) نیز بیان کردند که غلظت بالای 30 میلی‌گرم در لیتر هیومیک اسید در محیط مایع می‌تواند باعث تجمع نانوذرات TiO_2 و ZnO شود و در واقع با استفاده از هیومیک اسید می‌توان سمیت این مواد را کاهش داد. همچنین طبق بررسی که لی و همکاران (2011) انجام دادند دریافتند نوع محیط کشت تأثیر بسیار زیادی بر روی اثر سمیت نانوذره روی باکتری دارد بطوری که وقتی از محیط‌های ایزوتون و یا همراه با مواد ترکیبی مناسب استفاده شود اثر سمیت نانوذره کاهش می‌یابد. لی دلیل این کاهش جمعیت را کم شدن ترکیبات Zn^{2+} که برای باکتری سمی است، در محیط‌های ایزوتون و مغذی می-داند. بنابراین می‌توان به این گفته مهم اشاره شود که ترکیب نانو ذره نانوپروسیل-1 و ورمی‌کمپوست اثر نامطلوب ناشی از غلظت نانو ذره را کاهش می‌دهد.

این نتایج با سایر مطالعات نیز مطابقت دارد، بنتونیت علاوه بر ماده آلی کم بعد از جذب آب، حالت چسبنده و خمیری پیدا کرده و شرایط تهویه‌ای نامناسبی برای باکتری‌های هوازی *سودوموناس فلورسنس* ایجاد می‌کند (بشارتی وهمکاران،1383؛ خاوازی و همکاران، 1379) خاک فسفات نیز به دلیل فقدان مواد آلی، عناصر غذایی و ظرفیت نگهداری رطوبت بسیار پائین در ابتدا هم مقدار کمتری باکتری دریافت کرد و نتوانست حامل مناسبی باشد و ضعیف‌ترین حامل بود. وجود ورمی‌کمپوست با ماده آلی و رطوبت مناسب در تیمارهای 2، 6 و 7 باعث نگهداری جمعیت بالایی از باکتری‌ها شد. در مورد برتری تیمارهای ترکیبی 6 و 7 که حاوی نانوذره نانوپروسیل-1 بودند می‌توان این‌گونه بیان کرد که خاصیت رهاسازی کند عناصر غذایی، سطح ویژه بالا، واکنش پذیری و قدرت جذب بالای نانو مواد در کنار ماده آلی و رطوبت مناسب ورمی‌کمپوست به عنوان ماده غذایی و چسبندگی حاصل از بنتونیت سبب ایجاد یک فرمولاسیون مناسب و مطلوب برای باکتری می‌شود. همچنین بررسی سکار و همکاران (2010) نشان داد که ورمی‌کمپوست نسبت به لیگنیت توانایی بیشتری در نگهداری باکتری دارد و افزایش نسبت ورمی‌کمپوست به لیگنیت باعث افزایش جمعیت باکتری می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده و برتری تیمارهای ترکیبی نانوذره نانوپروسیل-1 و ورمی‌کمپوست نسبت به تیمار مجزای ورمی‌کمپوست می‌توان بیان کرد که استفاده از این ماده به عنوان ماده حامل و در مقادیر کمتر همراه با موادی با کربن آلی بالا می‌تواند منجر به تولید کودهای نانوبیولوژیک با توان نگهداری بالای باکتری شود.

یکی از خصوصیات مواد حامل که در تحقیقات به آن توجه کمتری شده، سطح ویژه مواد حامل و تأثیر این فاکتور فیزیکی بر روی توان نگهداری باکتری می‌باشد. ضریب همبستگی محاسبه شده (0/02-) بین سطح ویژه مواد حامل و جمعیت باکتری‌ها در پژوهش حاضر نشان داد، که سطح ویژه مواد حامل به تنهایی اثری در جمعیت حامل نداشته و لزوما داشتن سطح ویژه بالا به تنهایی نمی‌تواند فاکتور مؤثر، ضروری و مورد توجه در انتخاب حامل مناسب باکتری باشد.

لازم به ذکر است در مورد آنالیز تخلخل و اندازه حفرات حامل‌ها متأسفانه نتیجه صحیح و قابل قبولی حاصل نگردید. مواد مورد آزمایش در مقایسه با آنچه در منابع دیگر ذکر شده دارای تخلخل بسیار پائین‌تری می‌باشند، به عنوان مثال در تحقیقات گذشته از ورمی‌کمپوست به عنوان ماده با تخلخل بالا یاد می‌شود، در حالی که نتایج آنالیز نشان می‌دهد تخلخل ورمی کمپوست پائین بوده و با موارد قابل انتظار مطابقت ندارد. دلیل این امر را می توان این‌گونه توجیه کرد که در تحقیقات خاکشناسی برای اندازه‌گیری تخلخل از نمونه دست نخورده و به روش غیر مستقیم استفاده می‌شود، در حالی که در مورد مواد حامل امکان استفاده از این روش وجود ندارد و اندازه‌گیری به روش دستگاهی صورت می‌گیرد. مراحل آماده سازی مواد حامل مانند کوبیدن و عبور دادن از الک (60 مش) موجب تغییر و تخریب ساختمان این مواد شده و همچنین هنگام اندازه‌گیری تخلخل بوسیله دستگاه BEL sorp-mini مواد مذکور با درجات متفاوت فشرده می‌شوند و از آنجائی‌که تخلخل جزء خصوصیات پویا (دینامیک) است لذا این تغییر در ساختمان و اندازه ذرات نتایج مطلوبی را در نتایج آنالیز فراهم نمی‌کند. بنابراین توصیه مطالعه حاضر بر این است که در تحقیقات بعدی از روش‌های هزینه بر ذکر شده استفاده نشده و یا راه‌کارهای دیگری برای آنالیز ارائه گردد.

نتیجه‌گیری

نتیجه این مطالعه نشان داد استفاده از این فرم نانو ذره نانوپروسیل-1 (lus-1) به تنهایی به عنوان حامل در تولید زادمایه نانوبیولوژیک مناسب نبوده ولی در ترکیب با سایر مواد ترکیبی (ورمی‌کمپوست) نتایج مطلوبی را داشته و توانست جمعیت باکتری را در حد استانداردهای جهانی نگه دارد. با توجه به نتایج بدست آمده توصیه می شود در مطالعات بعدی از مقادیر مختلفی از این ماده در ترکیب با مواد دیگر (ورمی‌کمپوست) در تولید ماده حامل استفاده شده و بهترین فرمولاسیون ماده حامل تعیین گردد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که در تولید زادمایه‌های نانو بیولوژیک رعایت نکاتی از جمله: نوع و فرمولاسیون ماده حامل، ماده آلی، تخلخل داخلی، دما و رطوبت حائز اهمیت فراوان است. استفاده از حامل‌های دارای ماده آلی فراوان مانند ورمی‌کمپوست به میزان مناسب می‌تواند بقای باکتری‌ها را افزایش داده و به بهبود کارایی زادمایه نانو بیولوژیک کمک کند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مساعدت‌های بی‌دریغ جناب آقای دکتر بشارتی ریاست محترم موسسه خاک و آب که در فراهم نمودن امکانات لازم جهت پیشبرد امور نهایت همکاری را مبذول فرمودند سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از آقای دکتر علیرضا بدیعی به جهت همکاری در تهیه نانوذره نانوپروسیل-1 قدردانی می‌گردد.

جدول 1- انواع مواد حامل مورد مطالعه و مقدار سوسپانسیون باکتری اضافه شده

شماره	ماده حامل	مقدار سوسپانسیون باکتری (ml) اضافه شده براساس رطوبت FC به 50 گرم ماده حامل
1	نانوپروسیل -1 (Lus-1)	48
2	ورمی‌کمپوست (V)	43
3	خاک فسفات (R)	7
4	بنتونیت (B)	35
5	نانوپروسیل -1 + بنتونیت+ خاک فسفات (Lus-1+ B +R)	20
6	نانوپروسیل -1+ بنتونیت+ خاک فسفات+ ورمی کمپوست (Lus-1 + B+ R+ V)	30
7	نانوپروسیل -1+ بنتونیت+ ورمی کمپوست (Lus-1 + B+V)	34

جدول شماره2- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مواد حامل باکتری

ویژگی	ماده حامل			
	نانوپروسیل -1	ورمی‌کمپوست	خاک فسفات	بنتونیت
فسفر قابل جذب(ppm)	0	1375	0	0
نیتروژن (%)	0	7/4	0	0
سدیم محلول(ppm)	1120	173/4	16/9	255/53
پتاسیم محلول(ppm)	48/7	378/83	1/03	3/98
کربن آلی(%)	0	17/7	0	0
جرم مخصوص ظاهری (g/cm^3)	0/16	0/7	1/65	0/97
EC (dSm^{-1})	3/95	1/72	0/558	0/96
pH	9/3	7/34	7/64	8/02
منگنز قابل جذب($mgkg^{-1}$)	1/9	90/91	7/96	13/21
آهن قابل جذب ($mgkg^{-1}$)	4/07	112/86	8/27	15/1
مس قابل جذب ($mgkg^{-1}$)	0/78	12/85	0/41	1/52
روی قابل جذب ($mgkg^{-1}$)	0/72	53/1	3/38	0/51

جدول 3- مقادیر سطح ویژه و تخلخل حامل ها

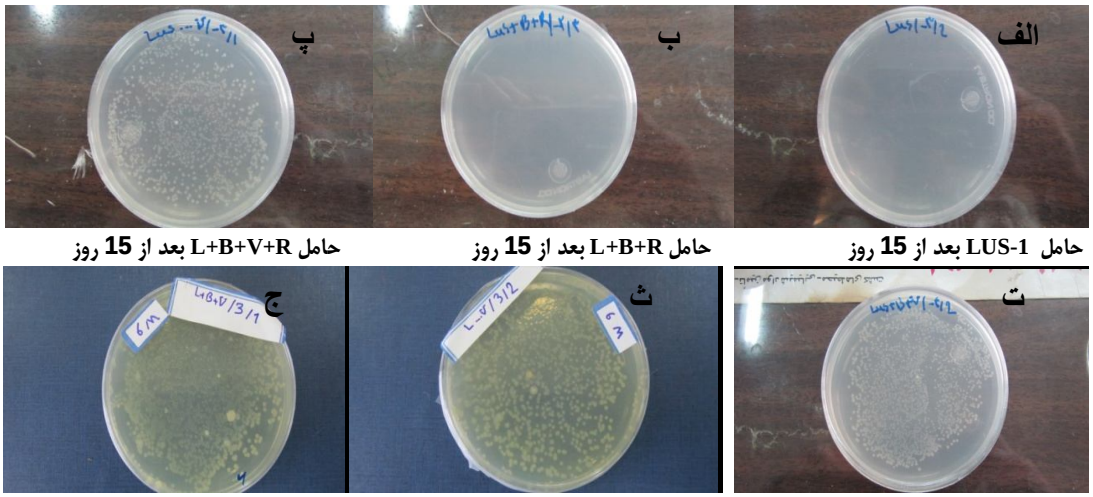
نوع حامل	سطح ویژه(BET) m^2/g	تخلخل		میانگین قطر حفرات داخلی(nm)
		(cm^3/g)	(%)	
نانوپروسیل -1	15/671	$5/976 \times 10^{-2}$	0/95	15/255
ورمی‌کمپوست	4/69	$2/346 \times 10^{-2}$	1/642	20/015
خاک فسفات	0/2602	$5/95 \times 10^{-3}$	0/9	91/517
بنتونیت	20/462	$5/98 \times 10^{-2}$	5/8	11/692

جدول 4- مقادیر تخمینی سطح ویژه فرمولاسیون های مختلف حامل

حامل	سطح ویژه تخمینی (m^2/g (BET
نانوپروسیل-1+ بنتونیت+ خاک فسفات	12/131
نانوپروسیل-1+ بنتونیت+ خاک فسفات+ ورمی‌کمپوست	10/27
نانوپروسیل-1+ بنتونیت+ ورمی‌کمپوست	13/6

جدول 5- تجزیه واریانس اثر تیمارها و زمان بر جمعیت باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس* (لگاریتم جمعیت باکتری)

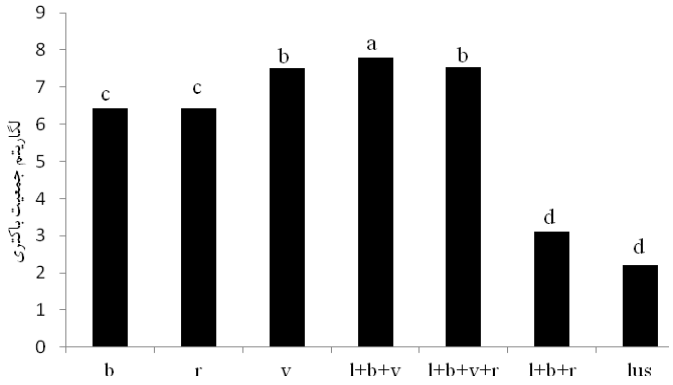
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
ماده حامل	6	12/5236**
زمان	7	236/9216**
ماده حامل x زمان	42	3/54**
CV (%)	-	6/5711



حامل LUS-1 بعد از 15 روز — حامل L+B+R بعد از 15 روز — حامل L+B+V+R بعد از 15 روز

حامل L+B+V بعد از 15 روز — حامل L+B+R+V بعد از 6 ماه — حامل L+B+V بعد از 6 ماه

شکل 1- وضعیت محیط کشت های حاوی نانو ذره نانوپروسیل-1 در زمان های مختلف



شکل 2- مقایسه میانگین بین توانایی نگهداری باکتری بوسیله حامل‌های مختلف

فهرست منابع:

1. Alimirza, M., Mirhosseini, H. and Moezardalaln, V. M. 2007. The survey on trend of nitrogen release from different nitrogen fertilizer sources in incubation studies. The proceedings of 10th soil Sciences Congress. Karaj. Iran 674-675.
2. Bonneviot, L., Morin, M. and Badie, A. 2003.US 0133868. (US Patent).
3. Besharati, H., Saleh rastin, N., Malakouti, M. and Alizade, A. 2004.The investigation on viability potential of *Thiobacillus* on several kinds of carriers. The journal of soil and water sciences 18 (2):170-181.
4. Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D. and R. Y. Surampalli. 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. Waste Management 30:504-520.
5. Carter, M.R. and Gregorich, E.G. 2008. P.1224. In: Soil Sampling and Methods of Analysis. 2nd (ed). Canadian Society of Soil Science.
6. Cigdem, K., and Merih, K. 2005. Effect of formulation on the viability of biocontrol agent, *Trichoderma harzianum* conidia. African Journal of Biotechnology. 85: 483–486.
7. Cui, H., Sun, C., Liu, Q., Jiang, J. and Gu, W. 2006. p. 1-6. In: Applications of Nanotechnology inAgrochemical Formulation, Perspectives, Challenges and Strategies. Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture. 2006 .Chinese Academy of Agricultural Sciences. Beijing. China.
8. Dearmon, I. A., Orlando, M.D., Rosenwald, A.J., Albert, F.K., Ralph, L.F. and Paul R.M. 1962. Viability and estimation of shelf-life of bacterial populations. Journal of Applied Microbiology 10: 422–427.
9. DeRosa, M.R., Monreal, C., Schnitzer, M., Walsh, R. and Sultan, Y. 2010. Nanotechnology in fertilizers. Nature Nanotechnol 5:91.
10. Ge, Y., Schimel, J. P. and Holden, P. A. 2011. Evidence for Negative Effects of TiO_2 and ZnO Nanoparticles on Soil Bacterial Communities. Environmental science technology 55:1659-1664.
11. Griffith, G. and Roughly, A.1992. The effect of moisture potential on growth and survival of root nodule, bacteria in peat culture and on seed. Journal of Applied Bacteriology 73: 7-13.
12. Holland, L. M., Cury, G. C., Periera, R. F., Ferreira, G. A., Sousa, A., Souse, E. M. and Lancellotti, M. 2011. Effect of mesoporous silica under Neisseria meningitides transformation process: Enviromental effects under meningococci transformation. Journal of nanobiotechnology 9: 28.
13. Hopkins, B.G. and Ellsworth, J.W. 2005. Trace metal toxicity from manure in Idaho: Emphasis on copper. P. In K. Copeland et al. (ed) Proc. Winter Commodity Schools. Univ Idaho Coop Ext Moscow 37:1-36.
14. Kaljet, S., Keyeo, F. and Amir, H.G. 2011.Influence of carrier materials and storage temperature on survivability of *rhizobium* inoculants.Asian journal of plant sciences 10 (6):331-337.
15. Khavazi, k. and Rejali, F. 1379. The use of some low-cost materials as carrier for *Bradyrhizobium japonicom*. Journal of soil and water 14(1): 36-45.
16. Laura, K., Lion, D.Y. and Alvarez, J. J. A. 2006.Comparative eco-toxicityof nanoscale TiO_2, SiO_2, and ZnO water suspention.Water research 40: 3527-3532.
17. Li, M., Zhu, L. and Lin, L. 2011. Toxity of ZnO nanoparticles to Escherchia coli: Mechanism and the influence of medium component. Enviroment science and technology 45:1977-1983.

18. Liang, J., Wu, R., Huang, T.S. and Worley, S. D. 2004. Polymerization of a hydantionylsicloxane on particles of silicon dioxide to produce a biocidalsand. J. Appl. Polym. Sci 97:1161-1166.
19. Liong, M., France, B., Bradley, K. A. and Zink, J. L. 2009. Antimicrobial activity of silver nanoparticle encapsulated in mesoporous silica nanoparticles. Advanced material 21:1684-1689.
20. Lindsay, W. L. and Norvell, W. A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Science Society of America Journal 42: 421-428.
21. Liu, X., Feng, Z., Zhang, S., Zhang, J., Xiao, Q. and Wang, Y. 2006. Preparation and testing of cementing nano-subnano composites of slowor controlled release of fertilizers. Scientia Agricultura Sinica 39:1598-1604.
22. Mashhadi, S. H. and Asgharzadeh, A. N. 2004. The comparison on effectiveness of some carriers for bacteria *Sinorhizobium meliloti in* order to alfa alfa inoculants production, The journal of agriculture and natural resources sciences and technologies 8: 63-74.
23. Mendes, F. and Videira, I. 2005. Residues of the Cork Industry as Carriers for the Production of Legume Inoculants. Av. Silva Lusitana 13(2):159-167.
24. Maynard, A., Oberdörster, G., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D. and Yang, H. 2005.Nanoparticles – known and unknown health risks". Journal of Nanobiotechnology 2:12.
25. Monreal, C.M. 2010. Nanofertilizers for Increased N and P Use Efficiencies by Crops. In summary of information currently provided to MRI concerning applications for Round 5 of the Ontario Research Fund-Research Excellence program 12-13.
26. Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Quigg, A., Santschi, P. H. and Sigg, L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17:372-386.
27. Pennell, K. D. 2002. P. 303-308. In J.H. Dane and G.C.Topp (Ed.). Methods of soil analysis. part 2. chemical and microbiological properties. Madison, Wisconsin. USA.
28. Pesenti, B.B., Ferdani, E., Mosti, M. and innocent, D. F. 1991. Survival of *Agrobacterium radiobacter* K84 on Various Carriers for Crown Gall Control. Applied and environmental microbiology 57(7): 2047-2051.
29. Qu, X., Hwang, Y.S. and Li, Q. 2010. Impact of sunlight and humic acid on the aggregation kinetics of nC_{60}. 240th ACS National Meeting. August 22-26.2010. Boston. MA.
30. Sahle-Demessie, E., Li, Z. and Sorial, G. 2010. Effects of natural organic matter on stability, transport and deposition of engineered nanoparticles in porous media. 240th ACS National Meeting. August 22-26. 2010. Boston. MA.
31. Sayes, C. M., Gobin, A. M., Ausman, K. D., Mendez, J., West, J. L. and Colvin, V. L. 2005. Nano-C_{60} cytotoxicity is due to lipid peroxidation. Biomaterials 26:7587-7595.
32. Sekar, R.K., and Karmegam, N. 2010. Earthworm casts as an alternate carrier material for biofertilizers: Assessment of endurance and viability of *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum*. Scientia Horticulturae 124: 286–289.
33. Shaviv, A. 2005. Controlled Release of Fertilizers. IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers, 28-30, Frankfurt, Germany.
34. Shih, Y.S., Wu, S.C. and Tseng, U.M. 2011. Effect of humic acid on the stability of TiO_2 and ZnO nanoparticles in water. 240th ACS National Meeting. August 22-26. 2011. Boston. MA
35. Somasegaran, P. and Hoben H. J. 1994. Hand book for rhizobia: methods in legume *Rhizobium* technology. Springer-verlag. New York.

36. Sparks, D.L. 1996. Method of soil Analysis. Part3. Chemical Methods. American Society of Agronomy. 1390.
37. Strijdom, B.W. and. Rensburg, H. J. 1981. Effect of Steam Sterilization and Gamma Irradiation of Peat on Quality of *Rhizobium* Inoculants. Applied and environmental microbiology 41(6): 1344-1347.
38. Tong, Z. H., Bischoff, M., Nies, L., Applegate, B. and Turco, R. F. 2007. Impact of fullerene (C_{60}) on a soil microbial community. Environ. Sci. Technol 41:2985-2991