ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸
صفحه ۷۲ - ۶۳

تاثیر نانوذرات نقره بر فلور باکتریایی خاک بالک و ریزوسفر پنبه

Impact of silver nanoparticles on bacterial flora of the cotton rhizosphere and bulk soil

ابراهیم کریمی*[۱]، اکرم صادقی[۱]

۱- به‌ترتیب مربی، استادیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

Karimi E*[1], Sadeghi A[1]

1- Instructor, Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ekarimi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۶)

چکیده

در این پژوهش تاثیر دو فرمولاسیون نانونقره LS2000 و L2000 بر جمعیت باکتریایی خاک ریزوسفر و بالک پنبه بررسی شد. پیش از کاشت بذر، خاک با غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ پی‌پی‌ام دو فرمولاسیون تیمار شد. نمونه‌های خاک ریزوسفر و بالک گیاه پنبه در مراحل گیاهچه، تشکیل کاسبرگ و تشکیل غوزه جمع‌آوری شد. شمارش باکتری در محیط کشت TSA انجام شد. برای نشان دادن تنوع باکتریایی در خاک تیمار شده با فرمولاسیون‌های نانونقره PCR–DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) انجام شد. تعداد کل باکتری‌های قابل کشت در نمونه‌های خاک در حدود 10^4 و 10^7 واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU) در هر گرم خاک خشک به‌ترتیب برای خاک بالک و ریزوسفر بود. تعداد متوسط باکتری‌های قابل کشت خاک در نتیجه تیمار خاک با غلظت‌های ۰ تا ۵۰ پی‌پی‌ام هر دو فرمولاسیون در مقایسه با کنترل کاهش پیدا کرد. اثر مهارکننده فوق برای فرمولاسیون LS2000 به‌ویژه در خاک ریزوسفری بیش‌تر از L2000 بود. تعداد کل باکتری ریزوسفر با پیشرفت مراحل نمو پنبه به‌طور معنی‌دار ($P \leq 0.01$) افزایش پیدا کرد. در مرحله گیاهچه، حساسیت فلور میکروبی به فرمولاسیون‌های نانونقره بیش‌تر بود و به‌ترتیب غلظت‌های ۵ و ۲۵ پی‌پی‌ام از LS2000 و L2000 به‌طور کامل از رشد باکتری‌های خاک ممانعت کرد. بر اساس نتایج مولکولی، تیمار خاک با LS2000 یا L2000 تنوع ژن *16S rDNA* در بالک و ریزوسفر پنبه را تغییر داد. نتایج مشخص کرد تاثیر LS2000 بر پروفایل PCR-DGGE ژن *16S rDNA* بیش‌تر از L2000 بود.

واژه‌های کلیدی

پنبه
فلور باکتریایی
نانوذرات نقره
DGGE

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]

مقدمه

نانوذرات نقره در صنعت، پزشکی و کشاورزی کاربردهای فراوانی دارد اما پتانسیل خطرات زیست محیطی آن به‌خصوص بر روی فلور میکروبی خاک‌های زراعی کشور تا کنون مطالعه نشده‌است. نانوذرات نقره یکی از معروف‌ترین و پرکاربردترین محصولات نانو فن‌آوری به شمار می‌رود. هر سال نزدیک به ۳۲۰ تن نانونقره در جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nowack et al. 2011). استفاده از نانوذرات نقره برای کنترل بیماری‌های گیاهی گزارش شده‌است (Katouli and Rahnama 2007; Katouli and Rahnama 2008). برای ورود یک آفتکش حاوی نانوذرات نقره به بازار ارزیابی ایمنی آن ضروری است و استفاده، عدم استفاده و یا موارد مصرف آن باید در یک چارچوب قانونی همانند سایر آفتکش‌های شیمیایی گزارش شود (Sanford et al. 2010; Khot et al. 2012). از آنجا که فرآیند رشد و واکنش‌های شیمیایی کاتالیستی در سطح اتفاق می‌افتند، مقدار مشخصی از ماده در مقیاس نانومتر بسیار فعال‌تر از همان مقدار ماده با دانه‌بندی بزرگ‌تر است (Limbach et al. 2007). این ویژگی‌ها ممکن است بر روی سلامتی و محیط زیست اثر منفی داشته باشد و منجر به بروز مسمومیت با نانوذرات نقره شود. نانو نقره گستره بالایی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت را تحت تاثیر خود قرار می‌دهد (Karimi and Mohseni Fard 2017; Karimi and Sadeghi 2019). نتایج یک بررسی علمی (Sondi and Salopek-Sondi 2004) نشان داد که ویژگی بازداری از رشد نانونقره در برابر باکتری وابسته به میزان غلظت نانوذرات نقره و همچنین غلظت اولیه باکتری‌های کشت شده دارد. در بررسی دیگری (Kim et al. 2007) از هر دو گروه باکتریایی گرم منفی (*Escherichia coli*) و گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*) برای مطالعه اثرات ضد باکتریایی نانونقره استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تاثیرپذیری باکتری‌های گرم منفی از باکتری‌های گرم مثبت بیشتر است. برخی مطالعات نشان می‌دهد که شکل نانوذرات نیز با میزان بازداری از رشد باکتری‌ها ارتباط دارد و اشکال سه گوش و مثلثی در مقایسه با اشکال میله‌ای و کروی و همچنین فرم یونی نقره به مراتب کشنده‌تر هستند (Tran et al. 2013). به‌دلیل تعدد مکانیسم‌های ضد میکروبی نانونقره میکروارگانیسم‌ها نمی‌توانند نسبت به نقره سازگار شوند و یا مقاومت پیدا کنند. این مسئله می‌تواند در کنار مزیت عدم ایجاد مقاومت به نانوسیلور در دنیای پزشکی، زنگ خطری برای ورود نانوذرات نقره به محیط زیست نیز باشد. چرا که طبیعت به ویژه محیط‌های خاکی سرشار از فلور میکروبی مفید و دارای عملکرد هستند. آسیب به باکتری‌هایی که در فرایند دنیتریفیکاسیون نقش دارند موجب گسست برگشت ناپذیر این فرایند طبیعی خواهد شد. این باکتری‌ها نیترات اضافی را به نیتروژن تبدیل نموده و با این کار نیترات تجمع یافته در محیط کم می‌شود. با تخریب این فرایند و افزایش نیترات در محیط جذب گیاهان کاهش یافته، اکوسیستم آلوده می‌شود و نیترات اضافی در آب نوشیدنی ظاهر می‌شود (Throback et al. 2007). برخی از باکتری‌های خاک در فرایند کنترل بیمارگرهای مهم گیاهی مؤثر بوده و حضورشان در خاک موجب کاهش مصرف سموم کشاورزی می‌شود. مزایای استفاده از این باکتری‌ها به‌ویژه انواع بومی آن در مدیریت بیمارگرهای زراعی و افزایش رشد گیاهان مطالعه و گزارش شده است (Karimi et al. 2012; Sadeghi et al. 2012; Sadeghi et al. 2014). ریزوسفر منطقه محدودی از خاک است که فعالیت‌ها و ترشحات ریشه گیاه به‌طور معنی‌دار بر روی بیولوژی و به‌ویژه میکروارگانیسم‌های آن اثر می‌گذارد. در مقابل به قسمت‌های دیگر خاک غیر از ناحیه ریزوسفر، بالک (bulk) می‌گویند. اگر چه تنوع و جمعیت باکتری در نواحی ریزوسفری بیشتر از بالک است اما هر دو ناحیه در تعادل اکوسیستم اهمیت دارند (Raaijmakers et al. 2009). ورود مقادیر بالای نانونقره (دوزهای سمی) به محیط‌های خاکی، جمعیت موثر میکروارگانیسم‌های بیوکنترل و محرک رشد گیاه را در طبیعت کم کرده و سبب فقر میکروبی خاک‌ها می‌شود. نانونقره تاثیر ضد میکروبی غیر انتخابی دارد و به‌صورت وسیع الطیف عمل می‌کند. به بیان ساده‌تر فلور میکروبی اعم از باکتری‌های مفید و یا غیر مفید به‌طور هم‌زمان تحت تاثیر نانونقره قرار می‌گیرد. بنابراین لازم است در این زمینه استانداردهای مصرف مقادیر بهینه توسط مراجع علمی تدوین شود تا از ورود بی رویه نانونقره به محیط‌های خاکی جلوگیری شود. این مطالعه با هدف بیان تاثیر مقادیر مختلف از دو نوع

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]

فرمولاسیون مختلف از نانوذرات نقره بر خاک ناحیه بالک و ریزوسفر گیاه پنبه انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای بررسی اندازه نانوذرات نقره، دو فرمولاسیون به نام‌های LS2000 و L2000 تولید شرکت نانو نصب پارس استفاده شد. ۲۵ میلی‌لیتر از هر فرمولاسیون به‌مدت ۵ دقیقه با سونیکاتور پروبی تیمار شد. فرمولاسیون همگن شده برای بررسی متوسط اندازه نانوذرات نقره با بهره‌برداری از تکنیک (Dynamic Light Scattering) DLS توسط دستگاه Particle Size Analyser مدل Stabiizer 200 مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. جهت اطمینان از تکرارپذیری روش سنجش اندازه‌گیری ۳ بار تکرار شد. برای آنالیز خاک مزرعه، از ۵ توده مختلف جمع‌آوری و به خوبی مخلوط شد. مقدار ۱ کیلوگرم از خاک برای آنالیز مشخصات و مواد آلی و معدنی به آزمایشگاه مرجع خاک شناسی دانشگاه تهران ارسال و مورد آزمایش قرار گرفت.

جهت ارزیابی اولیه تعیین دامنه غلظت موثر نانونقره بر روی فلور کل باکتریایی خاک، غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام از دو فرمولاسیون LS2000 و L2000 نانوذرات نقره همراه با آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزامید (جهت حذف رشد فلور قارچی) با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع TSB (Tryptic Soy Broth) استریل اضافه شد (Cho et al. 2005). برای تهیه سوسپانسیون میکروبی ۱۰۰ گرم از هر نمونه خاک مزرعه وزن شد و با استفاده از سرم فیزیولوژی (کلرید سدیم ۰/۹ درصد) به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسید. سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۳ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ نگهداری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل به هر ارلن حاوی نانوذرات نقره اضافه شد. ارلن‌ها) در شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از ٤ روز، با استفاده از سیستم طیف سنجی دستگاه میکروپلیت ریدر رشد فلور میکروبی با خواندن OD در طول موج ٦۰۰ نانومتر ارزیابی شد. (Choi and Hu 2008). پس از بررسی نتایج آزمایش فوق (ارزیابی تاثیر غلظت‌های بالای نانوذرات نقره) تاثیر غلظت‌های پایین شامل صفر، ۵، ۱۰، ۲۵، و ۵۰ پی‌پی‌ام از دو فرمولاسیون LS2000 و L2000 مطابق روش فوق بررسی شد.

در ارزیابی‌های گلخانه‌ای، بذور پنبه (رقم کوکر) در گلدان‌های پلی‌اتیلن ۲ کیلویی پر شده با خاک مزرعه پنبه واقع در ورامین کشت شد. توده‌های خاک قبل از پر کردن گلدان‌ها با غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۵ و۵۰ پی‌پی‌ام از هر دو فرمولاسیون L2000 و LS2000 نانوذرات نقره مخلوط شد. گلدان‌ها در گلخانه با شرایط مشابه شرایط مزرعه شامل شامل ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای روز ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شب ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۵ درصد نگهداری شد (Throback et al. 2007). این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. نمونه‌برداری از خاک ناحیه بالک و ریزوسفر در سه مرحله گیاهچه دو هفته‌ای (مرحله اول)، تشکیل کاسبرگ (مرحله دوم) و تشکیل غوزه (مرحله سوم) انجام شد. نمونه‌ها تا زمان بررسی در آزمایشگاه در فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در ادامه نیز جهت بررسی فلور باکتریایی ناحیه بالک و ریزوسفر خاک، یک گرم از خاک بالک و یا ناحیه ریزوسفری به ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حاوی ۰/۹ درصد کلرید سدیم اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر با دور ۸۰ rpm نگهداری شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل بر روی محیط کشت TSA (Tryptone Soya Agar) ریخته و با استفاده از پیپت پاستور پخش شد. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از ٢٤ ساعت کلنی‌های ظاهر شده بر روی سطح محیط کشت شمارش شد (Pascual et al. 2016). همچنین برای آنالیز فلور باکتریایی با سامانه DGGE نیز استخراج DNA از ۱ گرم خاک با استفاده از Ultra Clean soil DNA kit(MO BIO Laboratories, Inc) و بر اساس دستورالعمل آن انجام شد. برای آنالیز PCR-DGGE از جفت آغازگر اختصاصی ژن *16s rRNA* (GC U968F/L1401R) با توالی GC U968F: 5'CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGC ACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3' و L1401R: 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3' استفاده شد. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل دمای واسرشت اولیه °C ۹٤ به

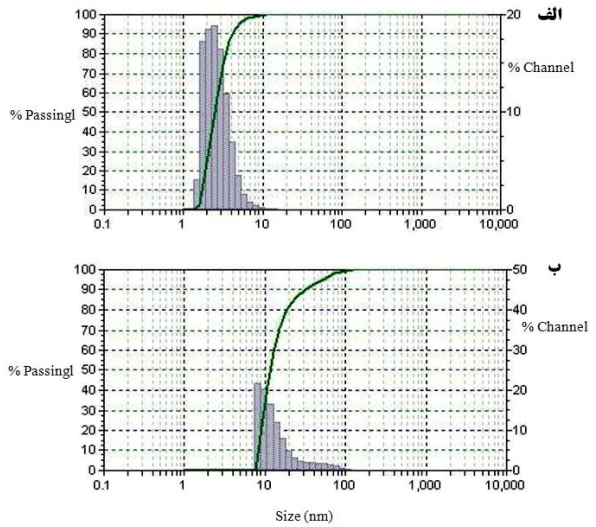
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]

مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر با دمای واسرشت C° ۹٤ به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال C° ۵۵ به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر C° ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی C° ۷۲ به مدت ۵ دقیقه بود (Saito et al. 2007). محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از سامانه DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ساخت شرکت Bio-Rad و بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد محتوی شیب ۷۰-۲۰ درصد از مواد واسرشت‌کننده اوره و فرمامید و با دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت با ولتاژ ۱۵۰ ولت الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، ژل‌ها ظرف حاوی ژل رد (۱:۱۰۰۰ رقیق شده در آب‌مقطر) به مدت ۳۰ تا ٤۵ دقیقه در شرایط تاریکی رنگ‌آمیزی و با استفاده از نور UV سیستم Syngene GBox Gel Documentation System مشاهده شد (Das et al. 2007).

نتایج

نتایج بررسی اندازه نانوذرات نقره نشان داد متوسط اندازه ذرات در دو فرمولاسیون LS2000 و L2000 به‌ترتیب برابر با ۲/۱ و ۹/۹ نانومتر است. هم‌چنین محدوده توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون LS2000 از ۱/٦ نانومتر (۳/۰۵ درصد) تا ۱۵/۱۹ نانومتر (۰/۱ درصد) و در فرمولاسیون L2000 از ۹/۰۳ نانومتر (۲۱/۷۵ درصد) تا ۱٤٤/۵ نانومتر (۰/۱ درصد) بود (شکل ۱). آنالیز خاک مورد مطالعه نیز نشان داد هدایت الکتریکی خاک استفاده شده برابر با ۰/۹۱ dS/m و در محدوده خاک‌های غیر شور قرار داشت. اسیدیته (pH) خاک برابر با ۷/۹۵ و در دامنه نسبتاً مناسب برای کشت پنبه بود. میزان پتاسیم و فسفر قابل استفاده و ماده آلی خاک نیز در دامنه قابل قبول قرار داشت. در مورد مقدار عناصر میکرو به‌جز عنصر روی، دیگر عناصر در دامنه مناسب غذایی قرار داشتند (جدول ۱).

در ارزیابی اولیه تعیین دامنه غلظت موثر نانوذرات نقره بر روی فلور کل باکتریایی خاک نتایج کشت سوسپانسیون خاک مزرعه در محیط TSA مایع نشان داد که در هیچ یک از غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام از دو فرمولاسیون L2000 و LS2000 هیچ نوع باکتری رشد نکرد. کشت سوسپانسیون خاک بر روی محیط TSA جامد نیز نتیجه‌ای یکسان داشت. با توجه به اثر ممانعتی بسیار زیاد مشاهده شده، از غلظت‌های پایین‌تر نانوذرات نقره برای ادامه بررسی استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها در این آزمایش نشان داد تعداد باکتری کل در واحد حجم محیط کشت به‌طور معنی‌داری ($p \leq 0.01$) تحت تاثیر غلظت و اندازه نانوذرات نقره قرار داشت. در غلظت ۵ پی‌پی‌ام فرمولاسیون LS2000 تعداد باکتری کل از ۵×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت به ۲×۱۰^{۵} و در غلظت ۱۰ و بالاتر از آن به صفر کاهش یافت. در مورد فرمولاسیون L2000 نیز بر روی محیط کشت حاوی غلظت‌های صفر تا ۲۵ پی‌پی‌ام رشد جمعیت باکتریایی دیده شد.



شکل ۱- نمودار محدوده توزیع اندازه نانوذرات نقره در الف) فرمولاسیون LS2000 و ب) فرمولاسیون L2000

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]

جدول ۱- نتایج آنالیز خاک مورد استفاده در آزمون‌های گلخانه‌ای

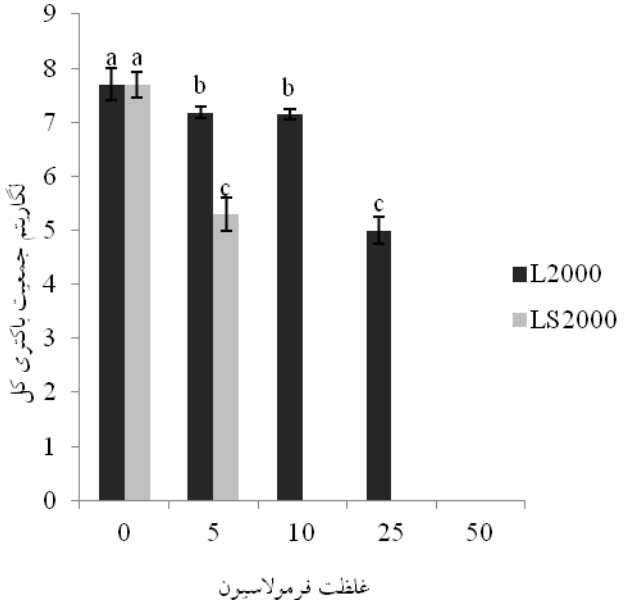
روی (mg/kg)	مس (mg/kg)	منگنز (mg/kg)	آهن (mg/kg)	بافت خاک	فسفر (ppm)	پتاسیم (ppm)	ازت کل (%N)	ماده آلی (%OM)	pH	EC (dS/m)
۱/٤	۱/۰٦	۱۱/۲	۹	C.L	۹/۲۷	۷٤۸/۲	۱/۱	۱۱/۰٤	۷/۹۵	۰/۹۱

جدول ۲- تجزیه واریانس تغییرات فلور کل باکتریایی خاک پنبه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف دو فرمولاسیون نانوذرات نقره

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
فرمولاسیون	۱	۵۹/۰۵۲۲۷**
غلظت	٤	۵۵/۷۰۷۲۷**
غلظت×فرمولاسیون	٤	۱۵/۱۰۸۲۷**
خطا	۲۰	۰/۰۰۲۳۳
کل	۲۹	
CV		۱/۲۱

** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد

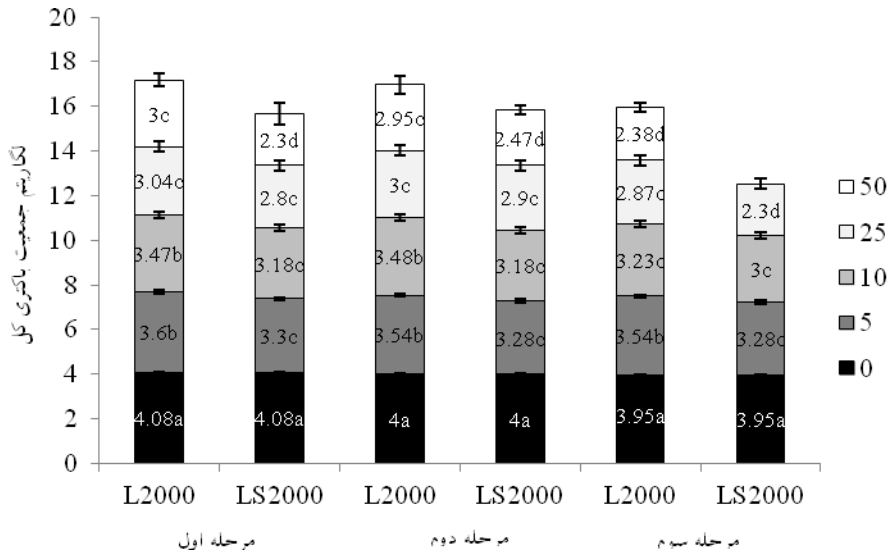
بررسی نتایج نشان داد تاثیر ممانعت از رشد فرمولاسیون L2000 کمتر از فرمولاسیون LS2000 بود؛ به گونه‌ای که جمعیت باکتری کل در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۵ پی‌پی‌ام از آن به‌ترتیب $۱/۵\times۱۰^{۷}$، $۱/٤\times۱۰^{۷}$ و ۱×۱۰^{۵} بود (شکل ۲ و جدول ۲). با توجه به نتایج به‌دست آمده از این دو آزمایش در بررسی‌های گلخانه‌ای از غلظت‌های ۰ تا ۵۰ پی‌پی‌ام استفاده شد.



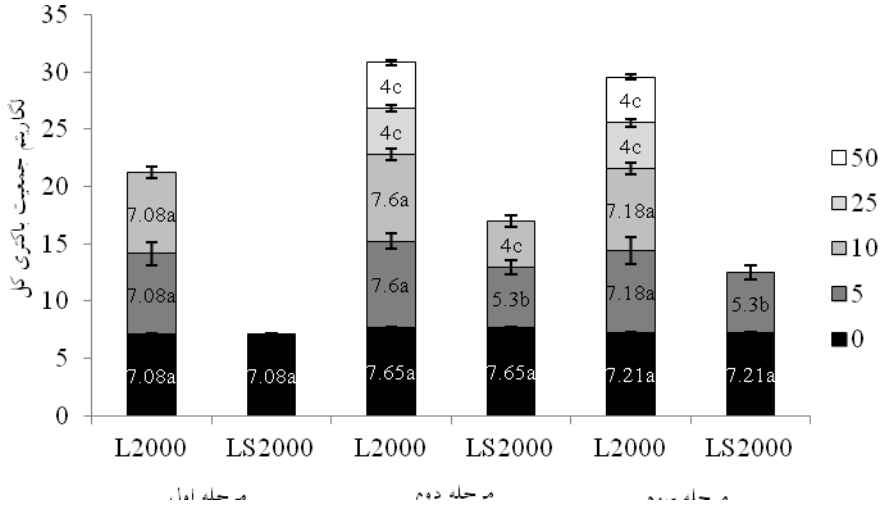
شکل ۲- تغییرات فلور کل باکتریایی خاک مزرعه پنبه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف دو فرمولاسیون LS2000 و L2000 نانوذرات نقره

نتایج بررسی فلور باکتریایی ناحیه بالک و ریزوسفر خاک در شرایط گلخانه نشان داد که در هر سه مرحله نمونه‌برداری، تاثیر بازدارندگی فرمولاسیون LS2000 بیشتر از فرمولاسیون L2000 بود. در هر دو فرمولاسیون با افزایش میزان غلظت، تعداد کلنی‌های باکتریایی به‌طور معنی‌داری ($P\leq0.01$) کم شد. جمعیت باکتریایی به‌دست آمده در مراحل مختلف نمونه‌برداری و رشد گیاه نیز متفاوت بود. در خاک بالک تیمار شده با غلظت‌های مختلف از هر دو فرمولاسیون به‌جز غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام LS2000 رشد باکتری مشاهده شد (شکل ۳ و جدول ۳). در نمونه‌های مربوط به خاک ریزوسفری به جز نمونه‌های مرحله دوم و سوم تیمار L2000 در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ پی‌پی‌ام رشد باکتری مشاهده نشد (شکل ٤ و جدول ۳). هم‌چنین در آنالیز فلور باکتریایی با سامانه DGGE، نتایج به‌دست آمده از PCR حاصل از جفت آغازگر GC U968F/L1401R مربوط به ژن 16S rDNA باکتریایی بر روی ژل آگارز یک درصد، یک باند نزدیک به bp ٤۰۰ را در همه نمونه‌های تهیه شده از ناحیه بالک و ریزوسفر تحت تاثیر دو فرمولاسیون L2000 و LS2000 نشان داد. این باند در نمونه‌های مربوط به خاک بالک و ریزوسفری تحت تاثیر فرمولاسیون L2000 در مقایسه با نمونه‌های خاک تحت تاثیر فرمولاسیون LS2000 واضح‌تر و ضخیم‌تر بود (شکل ۵).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]



شکل ۳- تغییرات لگاریتم فلور باکتریایی خاک بالک در مراحل مختلف رشد پنبه مرحله اول (گیاهچه) مرحله دوم (تشکیل کاسبرگ) و مرحله سوم (تشکیل غوزه) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف دو فرمولاسیون L2000 و LS2000 نانوذرات نقره



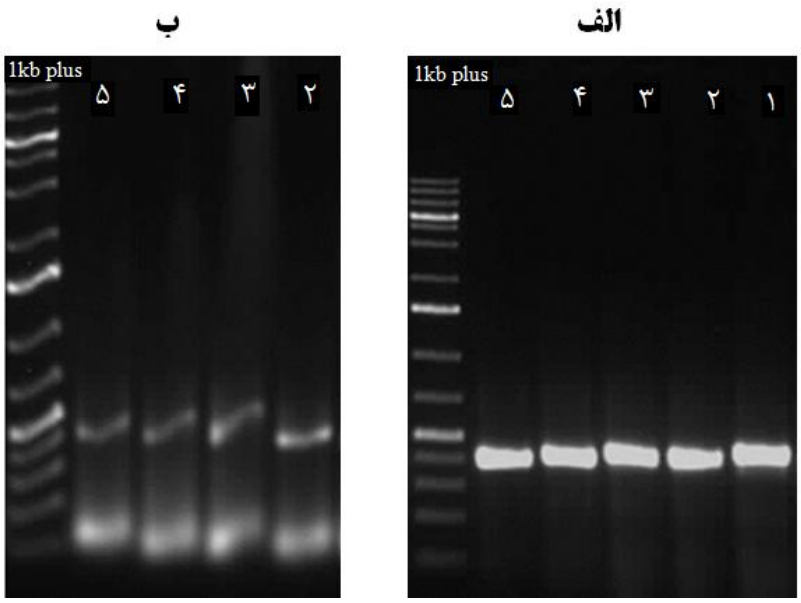
شکل ٤- تغییرات لگاریتم فلور باکتریایی خاک ریزوسفر در سه مرحله از رشد پنبه شامل مرحله اول (گیاهچه) مرحله دوم (تشکیل کاسبرگ) و مرحله سوم (تشکیل غوزه) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف دو فرمولاسیون L2000 و LS2000 نانوذرات نقره

جدول ۳- تجزیه واریانس تغییرات فلور باکتریایی خاک بالک و ریزوسفر در مراحل رشدی پنبه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف دو فرمولاسیون نانوذرات نقره

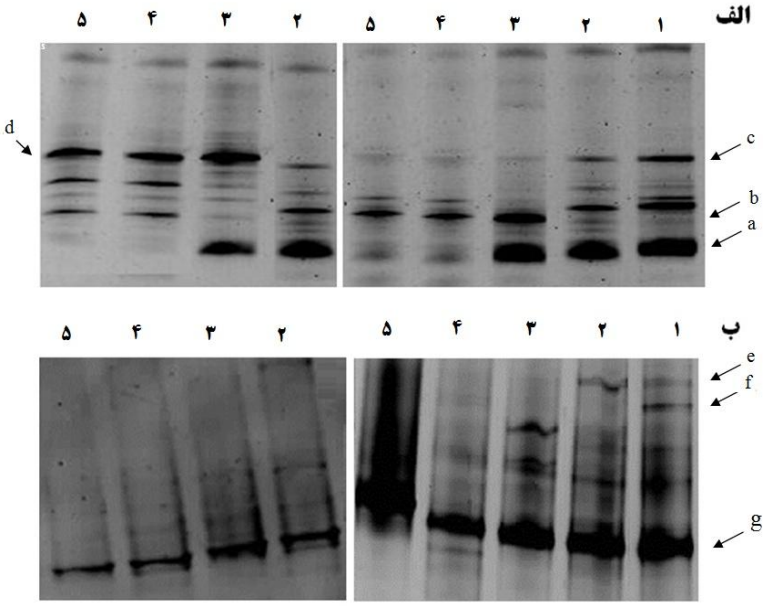
منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	
		فلور ناحیه بالک	فلور ناحیه ریزوسفر
مراحل رشد	۲	۱/۸۷۰۷۵**	۳۰/۰۷۶**
فرمولاسیون	۱	۳/۷۳۳۲۱**	۲۰۳/۵۸۱٤**
غلظت	٤	۸/٤۱۲۵۵**	۱۲۲/٦۹۹۷**
مراحل رشد×فرمولاسیون	۲	۰/٤٥٤٥۱**	۰/۹۲۳۱**
مراحل رشد× غلظت	۸	۰/۷۳۵۱٤**	۳/۰٦۳۸**
فرمولاسیون× غلظت	٤	۰/۹۲۲۵۱**	۲۰/۸۲۵۵**
مراحل رشد× فرمولاسیون× غلظت	۸	۰/۳۱۳۹۹**	۸/٤٥٦۸**
خطا	٦۰	۰/۰۰٤٥۳	۰/۰۰۲۳٦
کل	۸۹		
CV		۲/۱۵	۱/۲۳

** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]



شکل ۵- باند ٤٠٠bp محصول PCR ژن *16S rDNA* از روی ماده وراثتی (DNA) استخراج شده از خاک ریزوسفری گیاهچه پنبه تیمار شده با نانوذرات نقره الف) فرمولاسیون L2000 ب) فرمولاسیون LS2000. شماره‌های ۱ تا ۵ به‌ترتیب نمایشگر غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ پی‌پی‌ام هستند.



شکل ٦- پروفایل DGGE ژن *16S rRNA* در خاک الف) بالک و ب) ریزوسفری گیاهچه پنبه تیمار شده با نانوذرات نقره. سمت راست فرمولاسیون L2000 سمت چپ فرمولاسیون LS2000. شماره‌های ۱ تا ۵ به‌ترتیب نمایشگر غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ پی‌پی‌ام هستند.

الکتروفورز این تک باند با دستگاه DGGE بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد حاوی شیب مواد دناتوره کننده نشان داد که فرمولاسیون LS2000 در مقایسه با فرمولاسیون L2000 تاثیر بیشتری بر فلور باکتریایی هر دو منطقه بالک و ریزوسفر در هر سه مرحله نمونه‌برداری داشت. این تاثیر با افزایش غلظت هر دو فرمولاسیون نسبت مستقیم داشت. ضخامت تعدادی از باندها با افزایش غلظت نانوذرات نقره افزایش ویا کاهش یافت. کاهش قابل توجه باند a در خاک تیمار شده با غلظت ۲۵ و ۵۰ پی‌پی‌ام از هر دو فرمولاسیون نانوذرات نقره مشاهده شد. این کاهش برای باند c از غلظت‌های پایین تر نانوذرات نقره از نوع فرمولاسیون L2000 شروع و در فرمولاسیون LS2000 به‌طور کامل حذف شد. تغییر از نوع افزایش در باند b در تیمارهای فرمولاسیون L2000 و

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]

افزایش باند d در فرمولاسیون LS2000 نیز مشاهده شد (شکل ٦).

بحث

بسیاری از تحقیقات در زمینه سمیت نانومواد در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و بر روی سویه‌ها و کشت‌های خالص انجام شده و گزارش زیادی از تحقیق در شرایط طبیعی وجود ندارد. بنابراین، پیش از انجام هرگونه قانون‌گذاری در زمینه نانومواد، جمع‌آوری اطلاعات جامع و نزدیک به شرایط واقعی (*in vivo*) درباره تأثیر محصولات نانو بر سلامتی انسان و محیط زیست لازم و ضروری است (Zhang and Karn 2005; Wiesner et al. 2006; Klaine et al. 2008). بررسی‌های علمی جدید حاکی از وجود برخی چالش‌ها در زمینه درک درست از خطرات نانومواد هستند (Maynard et al. 2006; Holden et al. 2013). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که غلظت و اندازه نانوذرات نقره مورد استفاده در آزمون‌های *in vitro* و *in vivo*، دو فاکتور مهم و تاثیرگذار در توان کشندگی این محصولات هستند. با افزایش غلظت نانوذرات نقره و کاهش اندازه ذرات آن، جمعیت باکتریایی موجود در دو ناحیه بالک و ریزوسفری خاک به‌طور معنی‌داری کاهش داشت. سمیت میکروبی نانونقره، با کوچک‌تر شدن ذرات و به‌دنبال آن افزایش سطح واکنش، بسیار بالا می‌رود. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و فعالیت بیولوژیکی مواد در مقیاس نانو نسبت به حالت ماکروسکوپی‌شان تقویت می‌شود (Oberdorster et al. 2005; Maynard et al. 2006). این موضوع می‌تواند با کشندگی بالای نانونقره در دو فرمولاسیون L2000 و LS2000 (به‌ترتیب ۲/۱ نانومتر و ۹/۹ نانومتر) به‌کار رفته در این پژوهش مرتبط باشد.

روش‌های مولکولی گوناگونی جهت دستیابی به تنوع ژنتیکی فلور میکروبی خاک استفاده شده‌است. یکی از این روش‌ها، استفاده از سامانه DGGE است که دقت بالاتری نسبت به روش‌های دیگر دارد (May et al. 2001; Smalla et al. 2001; Nikolcheva et al. 2003; Das et al. 2007). بر خلاف روش‌های مرسوم در میکروب‌شناسی سنتی و مبتنی بر محیط کشت در بررسی با استفاده از DGGE می‌توان گونه‌های غیر قابل کشت میکروبی را نیز مورد ارزیابی قرار داد (Karimi and Mohammadi 2014). نتایج به‌دست آمده از بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر فلور باکتریایی خاک با استفاده از سامانه DGGE در این مطالعه نشان داد با افزایش غلظت و هم‌چنین کاهش اندازه نانوذرات نقره از شمار و همچنین ضخامت باندهای موجود در ژل اکریل آمید مربوط به نمونه‌های ناحیه بالک و ریزوسفر کاسته می‌شود. نتایج این آزمایش با نتایج ارزیابی‌های میکروبیولوژیکی مبتنی بر کشت در محیط‌های کشت مایع و جامد انجام شده در قسمت اول این مطالعه مطابقت داشت. تفاوت الگوی باندهای تکثیر شده نشان‌دهنده تفاوت گونه‌های باکتریایی موجود در خاک‌های تیمار شده با دو نوع فرمولاسیون LS2000 و L2000 است. از این مشاهدات می‌توان نتیجه گرفت که تحمل یا تاثیرپذیری گونه‌های میکروبی در برابر اندازه و غلظت نانوذرات نقره متفاوت است. کاهش شدید تعداد باندها در مقایسه با شاهد بازگوکننده تاثیر قابل توجه نانوذرات نقره بر فلور خاک است. در مطالعات مشابه تاثیر متفاوت نانوذرات نقره بر گونه‌های میکروبی گزارش شده‌است (Bradford et al. 2009; Sun et al. 2013; Gavanji et al. 2013; Kumar et al. 2014).

به‌عنوان نتیجه کلی می‌توان گفت استفاده بی رویه و بدون مدیریت از نانوذرات نقره در بحث بهداشت محیط و مزرعه می‌تواند اثرات منفی زیادی بر روی محیط زیست داشته باشد. هر چه اندازه این ذرات کوچک‌تر باشد افزایش غلظت آن بر شدت ضدیت میکروبی آن خواهد افزود. بنابراین در مورد کنترل باکتری‌های بیماری‌زا به‌جز موارد استثنا مانند برخی سویه‌های مقاوم به دارو بهتر است از ذرات بزرگ‌تر استفاده شود. لزوم ورود سازمان‌های نظارتی در بحث تولید چنین محصولاتی برای ترویج مصرف بهینه و کنترل شده از نانوذرات نقره و جلوگیری از آلودگی‌های زیست محیطی ضروری است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]

منابع

Bradford A, Handy RD, Readman JW, Atfield A, Muhling M (2009) Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. Environmental Science and Technology 43:4530-4536.

Cho KH, Park JE, Osaka T, Park SG. (2005) The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochimica Acta 51:956-960.

Choi O, Hu Z (2008) Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. Environmental Science and Technology 42:4583-4588.

Das M, Royer TV, Leff LG (2007) Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. Applied and Environmental Microbiology 73:756-767.

Davoudi A (2008) Application of nanosilver in decreasing of epiphytic community and management of fire blight in Qazvin gardens. In: 18th Iranian plant protection congress, Iran, Bu-Ali Sina University, (In Farsi).

Gavanji S (2013) The effects of silver nano particles on microorganisms: a review. Applied Scientific Reports 1:50-56.

Holden PA, Nisbet RM, Lenihan HS, Miller RJ, Cherr GN, Schimel JP, Gardea-Torresdey JL, Univ C (2013) Ecological nanotoxicology: integrating nanomaterial hazard considerations across the subcellular, population, community, and ecosystems levels. Accounts of Chemical Research 46:813-822.

Karimi E, Mohammadi A (2014) Principles of environmental and indusrrtial microbiology. Aradbook, Tehran. (In Farsi).

Karimi E, Mohseni Fard E (2017) Nanomaterial effects on soil microorganisms, In: Nanoscience and plant-soil systems, soil biology. Ghorbanpour M, Manika K, Varma A (Eds.) Springer International Publishing AG, 137-200.

Karimi E, Sadeghi A (2019) Toxicity effect of silver nanoparticles on two plant growth promoting *Streptomyces* spp. strains, phytopathogenic fungi *Fusarium solani* and phytopathogenic oomycetes *Pythium aphanidermatum* and *Pythium ultimum*. Modares Journal of Biotechnology 10:23-27.

Karimi E, Sadeghi A, Abbaszade Dehajib P, Dalvanda Y, Omidvarib M, Kakuei Nezhad M (2012) Biocontrol activity of salt tolerant *Streptomyces* isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet. Biocontrol Science and Technology 22:333-349.

Katouli N, Rahnama K (2007) Study on nanosilver effect on mycelial growth of *Fusarium moniliforme* causal agent of root rot and crown rot of rice and corn. Journal of Phytopathology and Food 1:6-14. (In Farsi).

Katouli N, Rahnama K (2008) Study on nanosilver effect on mycelial growth of *Fusarium moniliforme* causal agent of root rot and crown rot of rice and corn. In: 18th Iranian plant protection congress, Iran, Bu-Ali Sina University, (In Farsi).

Khot LR, Sankaran S, Maja JM, Ehsani R, Schuster EW (2012) Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. Crop Protection 35:64-70.

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 3:95-101.

Klaine SJ, Alvarez PJJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR (2008) Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environmental Toxicology and Chemistry 27:1825-1851.

Kumar N, Palmer GR, Shah V, Walker VK (2014) The effect of silver nanoparticles on seasonal change in arctic tundra aacterial and fungal assemblages. PLoS ONE 9:99953.

Limbach LK, Wick P, Manser P, Grass RN, Bruinink A, Stark WJ (2007) Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. Environmental Science and Technology 41:4158-4163.

May LA, Smiley B, Schmidt MG (2001) Comparative denaturing gradient gel electrophoresis of fungal communities associated with whole plant corn silage. Canadian Journal of Microbiology 47:829-841.

Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdörster G, Philbert MA, Ryan J, Seaton A, Stone V, Tinkle SS, Tran L, Walker NJ, Warheit DB (2006) Safe handling of nanotechnology. Nature 444:267-269.

Nikolcheva LG, Cockshutt AM, Bärlocher F (2003) Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. Applied and Environmental Microbiology 69:2548-2554.

Nowack B, Krug HF, Height M (2011) 120 Years of nanosilver history: implications for policy makers. Environmental Science and Technology 45:1177-1183.

Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro- Riviers N, Warheit D, Yan H (2005) Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and Fibre Toxicology 2:8.

Pascual J, Blanco S, García-López M, García-Salamanca A, Bursakov SA, Genilloud O, Bills GF, Ramos JL, Van Dillewijn P (2016) Assessing bacterial diversity in the rhizosphere of *Thymus zygis* growing in the Sierra Nevada National Park (Spain) through culture-dependent and independent approaches. PLoS One 11:1-19.

Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moenne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and Soil 321:341-361.

Sadeghi A, Karimi E, Abaszadeh Dahaji P, Ghorbani Javid M, Dalvand Y, Askari H (2012) Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28:1503-1509.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]

Sadeghi A, Soltani BM, Salehi Jouzani G, Karimi E, Khayam Nekouei M, Sadeghizadeh M (2014) Taxonomic study of a salt tolerant *Streptomyces* sp. strain C-2012 and the effect of salt and ectoine on lon expression level. Microbiological Research 169:232-238

Saito A, Ikeda S, Ezura H, Minamisawa K (2007) Microbial analysis of the phytosphere using culture-independent methodolofies. Microbes and Environments 22:93-105.

Sanford J, Venkatapathy R (2010) State of the science literature review: everything nanosilver and more. In: Varner K (Ed.) Scientific, technical, research, engineering, and modeling support final report. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development; Washington DC, 1-197.

Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H, Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Applied and Environmental Microbiology 67:4742-4751.

Sondi I, Salopek-Sondi B (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science 275:177-182.

Sun X, Sheng Z, Liu Y (2013) Effects of silver nanoparticles on microbial community structure in activated sludge. Science of the Total Environment 443:828-835.

Throback IN, Johansson M, Rosenquist M, Pell M, Hansson M, Hallin S (2007) Silver (Ag^+) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. FEMS Microbiology Letters 270:189-194

Tran QH, Nguyen VQ, Le AT (2013) Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology 4:033001.

Wiesner MR, Lowry GV, Alvarez P, Dionysiou D, Biswas P (2006) Assessing the risks of manufactured nanomaterials. Environmental Science and Technology 40:4336-4345.

Zhang WX, Karn B (2005) Nanoscale environmental science and technology: challenges and opportunities. Environmental Science and Technology 39:94-95.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-10]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.1.7.1]