



Evaluating modified Organoclays using Magnetite Nanoparticles and Bacterial Exopolysaccharide and their Effects on Urease, Phosphatase, and Dehydrogenase Soil Enzymes

Mahboobeh Abolhasani Zeraatkar^{1✉}, Amir Lakzian²

1. Corresponding Author, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, Email: m.abolhasani@uk.ac.ir

2. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Email: alakzian@um.ac.ir

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: Sep. 9, 2022

Revised: Dec. 10, 2022

Accepted: Dec. 28, 2022

Published online: Feb. 20, 2023

Keywords:

Montmorillonite,
X-ray diffraction,
Scanning electron
microscopy.

ABSTRACT

Soil enzymes are involved in processes such as decomposition of organic matter, food chain cycle, and degradation of contaminants. Therefore, it is very important to protect activity and stability of soil enzymes. This research was conducted at Ferdowsi University of Mashhad in 2017. In the present study, two types of organo-montmorillonites were produced by intercalating montmorillonite with magnetite nanoparticles and with an exopolysaccharide. The properties of the produced organoclays were studied using XRD and scanning electron microscopy (SEM). Effects of application of organo-montmorillonites to the soil on activities of urease, phosphatase, and dehydrogenase were investigated. The experiments were carried out using the completely randomized design with factorial arrangement employing four clay types (montmorillonite, NMM or montmorillonite intercalated with magnetite nanoparticles, ENMM or montmorillonite intercalated with both the exopolysaccharide and magnetite nanoparticles, and the control) at five durations (1, 3, 7, 14, and 21 days) with three replications. SEM images revealed that the best morphological changes happened in ENMM. Morphology images of this organoclay showed that it had small layers with abundant pores, the exopolysaccharide surfactant completely separated the clay layers and created abundant pores thus preventing nanoparticle aggregation. Results of the statistical analysis indicated that adding MM, NMM, and ENMM to the soil increased urease activity by 1.4-, 1.5-, and 3-fold, respectively. Moreover, activity levels of phosphatase enzyme increased by 1.1-, 1.3-, and 1.5-fold when MM, NMM, and ENMM were added to the soil, respectively and dehydrogenase activity increased by 1.1-, 1.2-, and 1.3-fold when MM, NMM, and ENMM were applied to the soil, respectively. Results indicated that the change in the soil environment surrounding the enzymes with the exopolysaccharide surfactant and magnetite nanoparticles increased activity and stability of enzymes in soil during the 21-day incubation period.

Cite this article: Abolhasani Zeraatkar, M., & Lakzian, A. (2023). Evaluating Organoclays Produced using Magnetite Nanoparticles and Bacterial Exopolysaccharide and their Effects on Urease, Phosphatase, and Dehydrogenase Soil Enzymes. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 53 (12), 2721-2738. <https://doi.org/10.22059/ijswr.2022.348435.669358>

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2022.348435.669358>



ارزیابی رس‌های اصلاح‌شده با نانوذرات مگنتیت و اگزوپلی ساکارید باکتریایی و تاثیر آن‌ها بر فعالیت

آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز و دهیدروژناز خاک

محبوبه ابوالحسنی زراعتکار^۱، امیر لکزیان^۲۱. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. ایمیل: m.abolhasani@uk.ac.ir۲. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. ایمیل: alakzian@um.ac.ir

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۱

واژه‌های کلیدی:

مونتوریلونیت،
پراش اشعه ایکس،
میکروسکوپ الکترونی روبشی.

آنزیم‌های خاک در فرایندهایی نظیر تجزیه مواد آلی، چرخه عناصر غذایی و تجزیه آلاینده‌ها نقش مهمی دارند. بنابراین حفظ فعالیت و پایداری آنزیم‌ها در خاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در این مطالعه دو نوع رس مونتوریلونیت تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت و اگزوپلی ساکارید تهیه شدند. خصوصیات رس‌های تهیه شده با کمک دستگاه‌های پراش اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. سپس تاثیر افزودن رس‌های مونتوریلونیت تغییر یافته بر فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز و دهیدروژناز بررسی شد. آزمایش‌های فوق در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل شامل چهار نوع رس (مونتوریلونیت، مونتوریلونیت تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت، مونتوریلونیت آلی شده با اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت و شاهد) در پنج زمان (۱، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) با سه تکرار انجام شد. در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی بهترین تغییرات مورفولوژی مربوط به رس تغییر یافته با مجموع سورفکتانت اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت بود، سورفکتانت اگزوپلی ساکارید لایه‌های رس را بطور کامل از هم باز و تخلخل‌های فراوانی در آن ایجاد و از تجمع نانوذرات نیز جلوگیری کرد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز آماری میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز با افزودن رس مونتوریلونیت به خاک ۱/۴ برابر، رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت ۱/۵ برابر، رس تغییر یافته با اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت ۳ برابر افزایش یافت. همچنین میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز با افزودن رس مونتوریلونیت به خاک ۱/۱ برابر، رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت ۱/۳ برابر، رس تغییر یافته با اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت ۱/۵ برابر افزایش نشان داد و میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز با اضافه کردن رس مونتوریلونیت به خاک ۱/۱ برابر، رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت ۱/۲ برابر، رس تغییر یافته با اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت ۱/۳ برابر افزایش نشان داد. بنابراین با توجه به نتایج مشاهده شد که ایجاد تغییرات در محیط اطراف آنزیم‌ها با سورفکتانت اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت باعث افزایش پایداری و فعالیت آنزیم‌ها در محیط خاک در مدت زمان ۲۱ روز انکوباسیون شد.

استناد: ابوالحسنی زراعتکار؛ محبوبه، لکزیان؛ امیر، (۱۴۰۱). ارزیابی رس‌های اصلاح‌شده با نانوذرات مگنتیت و اگزوپلی ساکارید باکتریایی و تاثیر آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های

اوره‌آز، فسفاتاز و دهیدروژناز خاک، تحقیقات آب و خاک ایران، ۵۳ (۱۲)، ۲۷۲۱-۲۷۳۸. <https://doi.org/10.22059/ijswr.2022.348435.669358>

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2022.348435.669358>

مقدمه

در جهان امروزی که همه چیز در حال توسعه و پیشرفت می‌باشد، هیچ علمی بدون تکیه بر همکاری‌ها و تحقیقات بین رشته‌ای نمی‌تواند پیشرفت حاصل نماید. در کشاورزی فناوری نانو جایگاه خوبی به دست آورده است تا حدی که بخش‌های مختلف زراعت، باغبانی، گیاه‌پزشکی، علوم خاک، شیلات، دام و طیور را تحت تاثیر قرار داده است. ذرات نانو به دلیل داشتن اندازه کوچک، سطح رویه زیاد، شکل کریستالی، نظم شبکه‌ای منحصر به فرد و واکنش‌پذیری بسیار بالا در حفظ زیست توده میکروبی، فعالیت و پایداری آنزیم‌ها نقش دارند (Cullen *et al.*, 2011; Nabati *et al.*, 2011; Ghosha *et al.*, 2012; Chapman & Stenzel, 2019). نانو ذرات مگنتیت به علت خواص مغناطیسی عالی، سمیت کم، کوچکی ذرات، زیست سازگاری، پایداری بالا و فرایندهای جداسازی آسان با بکارگیری یک میدان مغناطیسی مورد توجه ویژه قرار گرفته و موضوع بسیاری از پژوهش‌ها در دهه اخیر شده‌اند (Jiang *et al.*, 2015; Karimi *et al.*, 2019). مواد در مقیاس نانو، خواصی متفاوت از خود بروز می‌دهند. خاصیت مغناطیسی از جمله خواصی است که به شدت به اندازه ذره وابسته است. به عنوان مثال، در مواد فرومغناطیس وقتی اندازه ذره از یک حوزه‌ی مغناطیسی منفرد کوچک‌تر گردد، پدیده‌ی سوپرپارامغناطیس به وقوع می‌پیوندد. نانوذرات سوپرپارامغناطیس کاربردهای زیادی در فروسیال‌ها، سردسازی مغناطیسی، سم‌زدایی از سیال‌های بیولوژیکی و جداسازی‌های سلول دارند (Theerdhala *et al.*, 2010).

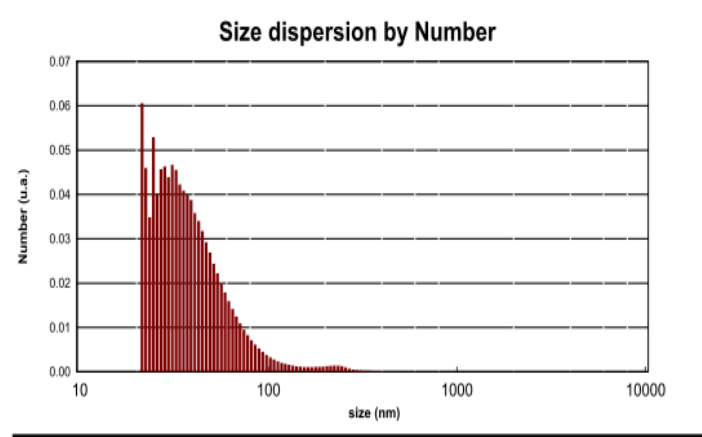
از جمله مشکلات اساسی این نانو ذرات آهن‌دار این است که به علت وجود فعالیت سطحی در دراز مدت نمی‌توانند جدا باشند و تجمع پیدا می‌کنند (Nurmi *et al.*, 2005; Rudnicki *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2017). نگهداری نانوذرات روی پلیمر (Novakova *et al.*, 2003)، منافذ سیلیکات‌ها (Bruce *et al.*, 2004) و زئولیت‌ها (Arruebo *et al.*, 2006) از روش‌های موثر در کاهش تجمع نانوذرات مورد استفاده گزارش شده است. در برخی از مطالعات برای رفع این مشکل، نانو ذرات آهن را روی سطوح کربن فعال نگهداری کرده‌اند (Houch *et al.*, 2008)، اما Li & Wu (2010) از کانی‌های رسی که فراوان، سازگار با محیط و بسیار ارزان‌تر از کربن فعال است، بعنوان نگهدارنده نانو ذرات استفاده نمودند و گزارش کردند که ترکیب سورفکتانت و کانی رسی باعث رفع این مشکل شده و می‌تواند کاربرد بسیار گسترده و مفیدی در کشاورزی و محیط زیست داشته باشد. کانی مونتموریلونیت فیلوسیلیکات‌های نوع ۲:۱، دی اکتاهدرال با بار لایه‌ای ۰/۴-۰/۲ هستند که دارای درجه هیدراسیون، سطح رویه، ظرفیت تبادل کاتیونی، گنجایش نگهداری آب و قدرت جذب بالایی می‌باشند، از این رو جزء کانی‌های مهم در بخش رس خاک محسوب می‌شوند (Galindo Gonzalez *et al.*, 2005). مونتموریلونیت یک کانی ارزان، فراوان با خصوصیات عالی است که در کشاورزی، محیط زیست، صنعت و مهندسی دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. این کانی به خوبی کاتیون‌های فلزی را جذب می‌کند، اما ظرفیت پایینی برای جذب آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و سایر ترکیبات آلی با بار منفی و خنثی دارد. حال اگر یون‌های غیر آلی کانی با یون‌های آلی جایگزین شود، رس آلی تشکیل شده که توانایی جذب ترکیبات آلی غیر یونی و آنیون‌ها را دارد (An & Stefan, 2007; Anakli, 2019; Alshabanat & Al-Anazy, 2019; Johnatan *et al.*, 2020).

اگزوپلی ساکاریدها توانایی جذب بسیار بالا و نیروی ثقل پایینی دارند و ترکیب آن با کانی‌های رسی باعث افزایش توانایی جذب کانی می‌شود (An & Stefan, 2007). ترکیب مونتموریلونیت و اگزوپلی ساکاریدها نقش موثری در سازگاری زیستی، تجزیه پذیری بیولوژیکی و فعالیت میکروبی دارد (Hsu *et al.*, 2009, 2012; Rao *et al.*, 2010). از طرفی اگزوپلی ساکاریدها نقش عامل کیلیت‌گر را در نانو ذرات دارند و نانو ذرات در این حالت پایدارتر و برای مدت طولانی ثابت هستند و توانایی جذب ذرات ریزتر و با غلظت بسیار پایین را پیدا می‌کنند (Ruiz Hitzky *et al.*, 2008). همچنین استفاده از اصلاح‌کننده‌های آلی اثر سمیت نانو ذرات را کاهش می‌دهد (Cullen *et al.*, 2011).

بنظر می‌رسد که نانوکمپوزیت حاصل از ترکیب رس مونتموریلونیت، نانو ذرات مگنتیت و اگزوپلی ساکاریدها بتواند در پایداری و فعالیت آنزیم‌ها بسیار مفید و کارآمد باشند. حفظ توده زنده میکروبی، فعالیت و پایداری آنزیم‌ها و معدنی شدن عناصر باعث باروری خاک، افزایش فراهمی عناصر غذایی، حاصلخیزی خاک و کشاورزی پایدار می‌شود (Bastida *et al.*, 2008; Dick, 2010). حفظ باروری و حاصلخیزی خاک یک امر ضروری برای تولید و کشاورزی پایدار است. بنابراین با توجه به اهمیت آنزیم‌ها و نقش بسیار موثر آن در کشاورزی پایدار، این مطالعه با هدف ساخت ارگانو مونتموریلونیت تغییر یافته با ذرات نانو مگنتیت و اگزوپلی ساکارید باکتریایی، طبیعی و کم هزینه، و تاثیر آنها بر فعالیت و پایداری آنزیم‌های مهم خاک نظیر اوره‌آز، فسفاتاز و دهیدروژناز انجام شد. تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه در سطح دنیا صورت نگرفته است، لذا انجام پژوهش و مطالعه در این زمینه ضروری بنظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

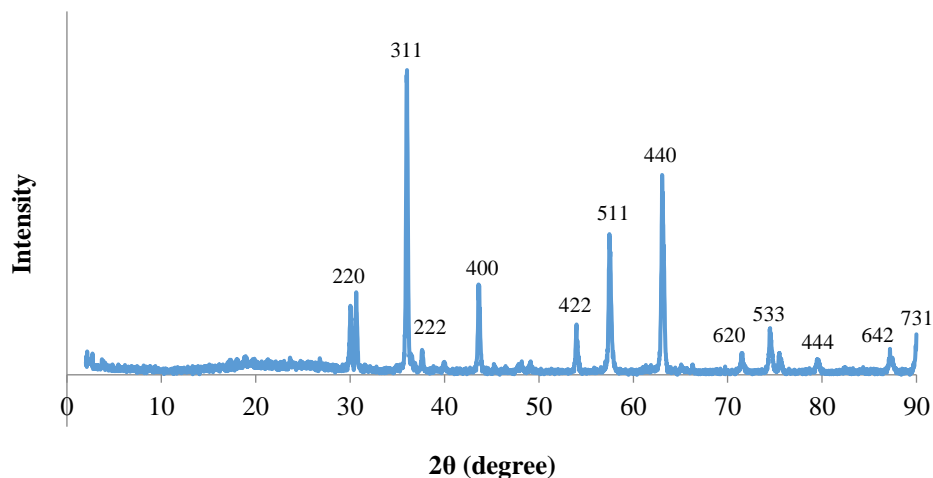
این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. رس مونتوریلونیت سدیم‌دار مورد استفاده در این پژوهش از کشور آمریکا با خلوص ۹۵ درصد و سطح ویژه ۷۲۵ مترمربع بر گرم تهیه شد. ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) رس مونتوریلونیت با استفاده از روش استات آمونیوم (Zhu et al., 2007) ۸۹/۹ سانتی مول بار مثبت بر کیلوگرم رس تعیین شد. در این پژوهش رس مونتوریلونیت تهیه شده MM نام‌گذاری شد. سورفکتانت اگزوپلی ساکارید از باکتری ازتوباکتر خاک استخراج شد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از نوع آزمایشگاهی بوده و جهت تهیه محلول‌ها و شستشو از آب مقطر و آب بدون یون استفاده شد. نانوذرات مورد استفاده در این پژوهش از شرکت نوترینو با خلوص ۹۹ درصد تهیه شد. بررسی‌های اولیه برای اطمینان از اندازه کریستالی، ترکیب شیمیایی و فاز نانوذرات انجام گرفت. میانگین قطر واقعی ذرات با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری ذرات ۴۳/۱۵ نانومتر تخمین زده و نمودار پراکنش قطر ذرات تهیه شد (شکل ۱).



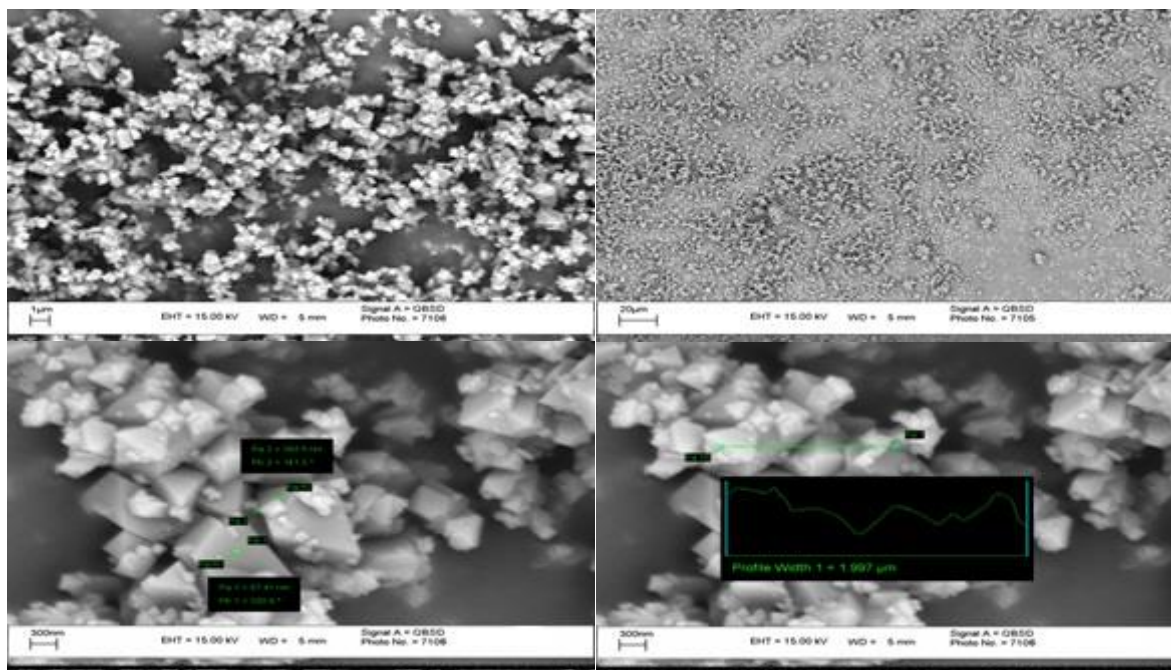
شکل ۱- پراکنش قطر ذرات نانومگنتیت

دیفرکتوگرام اشعه ایکس در شکل ۲ نشان داده شده است و توسط نرم افزار (X'pert) تفسیر گردید و پیک‌های قابل رویت به ترتیب مربوط به صفحه‌های بلوری (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۳۲۲)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱)، (۴۴۰)، (۶۲۰)، (۵۳۳)، (۴۴۴)، (۶۴۲) و (۷۳۱) است که با تطابق پیک‌های این صفحات و زوایه‌هایی پراش مربوط به آن‌ها با کارت شماره (۱۹-۰۶۲۹) کمیته مشترک پراش‌نگاری استاندارد پودرها (Yu & Kowak, 2010)، مگنتیت بودن ذرات تایید شد.

شکل ۳ تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی نانوذرات را نشان می‌دهد که مشخص کننده مورفولوژی ذرات است.



شکل ۲- دیفرکتوگرام اشعه ایکس (XRD) نانوذرات مگنتیت



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترون روبشی (FESEM) نانوذرات مگنتیت در بزرگنمایی‌های مختلف

تهیه رس‌های مونتموریلونیت تغییر یافته با نانو ذرات مگنتیت و اگزوپلی ساکارید

جهت تهیه رس مونتموریلونیت تغییر یافته با نانو ذرات مگنتیت ابتدا نانوذرات مگنتیت تهیه شده در آب مقطر ریخته و اکسیژن‌زدایی صورت گرفت. محلول رویی برداشته و مجدد ذرات رسوب داده با آب مقطر شسته شد، عمل شستشو ۴ مرتبه تکرار شد. محلول اسید کلریدریک ۰/۰۱ مولار به رسوب اضافه و تکان داده شد تا بارهای منفی نانوذرات خنثی شود. نانوذرات کلوئیدی کاتیونی در مدت زمان ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و با اضافه کردن آب به شدت همزده شد. محلول کلوئید کاتیونی (هیدروسل مگنتیت) حاصل دارای pH حدود ۴ بود. برای تهیه مونتموریلونیت پوشیده شده با نانوذرات، سوسپانسیونی از ۱ گرم رس مونتموریلونیت به ازای هر ۲۰ میلی لیتر آب تهیه و هیدروسل مگنتیت با حجم معادل به سوسپانسیون مونتموریلونیت اضافه و حدود یک دقیقه گاز نیتروژن وارد سوسپانسیون حاصل شد. سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی همزده شد. محلول رویی برای ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و بی‌رنگی محلول رویی بررسی شد. بی‌رنگی شاخصی است که نشان می‌دهد نانوذرات کاملاً جذب ذرات رس شده‌اند. محلول رویی بی‌رنگ دور ریخته و مجدد هیدروسل مگنتیت اضافه شد. ماده جامد جداسازی و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در خلا خشک شد (Yuan et al., 2009). در این پژوهش رس تهیه شده با استفاده از نانوذرات مگنتیت NMM نام‌گذاری شد. نمونه‌های آماده شده جهت آزمایش‌های بعدی در دسیکاتور نگهداری شد.

جهت تهیه رس مونتموریلونیت تغییر یافته با نانو ذرات مگنتیت و اگزوپلی ساکارید ابتدا باکتری ازتوباکتری از مرکز تحقیقات تهران تهیه شد. باکتری ازتوباکتری در محیط کشت دارای گلوکز ۵ گرم، مانیتول ۵ گرم، K_2HPO_4 ۰/۹ گرم، KH_2PO_4 ۰/۱ گرم، $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۱ گرم، K_2SO_4 ۰/۱ گرم، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۱ گرم، $NaCl$ ۰/۲ گرم، $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ۰/۱ گرم، $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ۰/۰۵ گرم و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر بازکشت شد. جهت استخراج اگزوپلی ساکارید این باکتری بعد از گذشت مدت زمان ۱۲۰ ساعت محیط کشت کاملاً هم زده شد و عمل سانتریفیوژ به مدت زمان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه صورت گرفت. محلول رویی جداسازی و به آن آمونیم استات ۱ مولار اضافه شد. جهت رسوب اگزوپلی ساکارید در محلول دو برابر محلول رویی ایزوپروپانول سرد اضافه و رسوب حاصل در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و توزین شد (Gauri et al., 2009)، در مرحله اول نانوکمپوزیت (NMM) تهیه شد. سپس برای تهیه مونتموریلونیت تغییر یافته با سورفکتانت اگزوپلی ساکارید در هر مرتبه ۲/۵ گرم رس در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و جهت پراکندگی یکنواخت رس در سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در مقابل امواج ماورای صوت قرار گرفت. ۴ گرم اگزوپلی ساکارید در ۱۹۶ میلی لیتر آب مقطر ریخته و pH آن حدود ۵ تنظیم شد. اگزوپلی ساکارید به آرامی و به صورت دورانی به رس اضافه شد، سرعت پمپ شدن آن حدود ۵۰ میلی لیتر در ساعت بود. در حین ریختن سوسپانسیون، رس به شدت همزده شد. سپس همزدن این سوسپانسیون در دمای ۶۰ درجه



سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت ادامه پیدا کرد. برای اینکه pH سوسپانسیون به حدود خنثی برسد چندین مرتبه عمل سانتریفیوژ و شستشو انجام شد. در نهایت جداسازی رس با سانتریفیوژ با دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت و رسوب حاصل در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک، ساییده و از الک ۲۰۰ مش عبور داده شد (Monvisade & Siriphannon, 2009). در این پژوهش رس تهیه شده با استفاده از نانوذرات مگنتیت و سورفکتانت اگزوپلی‌ساکارید ENMM نام‌گذاری شد.

خصوصیات رسی‌های تهیه شده

خواص مواد تهیه شده به شکل و اندازه آن‌ها بستگی دارد. فاصله بین لایه‌ای رس‌ها با روش پراش اشعه ایکس (XRD) بررسی و توسط نرم‌افزار (X'pert) تعیین گردید. دستگاه پراش اشعه ایکس سیستم X'pert-MPD شرکت فیلیپس بود. طیف‌های دیفرانکتومتری اشعه ایکس در محدوده زوایه‌های ۲-۴۰ درجه و لامپ هدف مس با تابش $K\alpha Cu (\lambda=1.54A^\circ)$ بود. در این آزمایش‌ها ولتاژدهی شتاب دهنده ۴۰ کیلووات و جریان پرتو ۳۰ میلی‌آمپر بکار گرفته شد. در ضمن سرعت روبش زاویه θ روی میزان یک درجه در دقیقه تنظیم شد. خصوصیات ساختاری و مورفولوژی با میکروسکوپ الکترونی روبشی انتشار میدانی (FESEM) تعیین شد. لذا جهت تهیه تصاویر از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل Tscan Vega-II استفاده شد.

تاثیر کاربرد رسی‌های تهیه شده بر آنزیم‌های خاک

در مرحله بعدی تحقیق نمونه‌برداری مرکب از عمق ۲۰ سانتی‌متر خاک مزرعه صورت گرفت. ذرات درشت و سنگ‌ها از خاک جداسازی شد. خاک مزرعه ابتدا از الک ۸ میلی‌متر و سپس از الک ۲ میلی‌متر عبور داده شد. بافت خاک مزرعه لوم شنی (۶۷ درصد شن، ۱۰ درصد رس و ۲۳ درصد سیلت) تعیین شد. هدایت الکتریکی خاک (شوری خاک) $4/2$ دسی‌زیمنس بر متر، کربن آلی $0/4$ درصد و pH خاک $7/9$ اندازه‌گیری شد. به عبارتی خاک دارای بافت متوسط، شور و تا حدودی قلیایی بود. نمونه خاک در ظروف پلی اتیلن ریخته و جهت عمل تهویه چند سوراخ روی آن‌ها ایجاد شد. نمونه خاک به مدت ۷ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و رطوبت روزانه نمونه‌ها در ۶۰ درصد ظرفیت نگهداری آب تنظیم شد. بعد از گذشت ۷ روز از شروع انکوباسیون به ازای هر گرم خاک مرطوب ۱۰ میلی‌گرم رس تغییر یافته (نسبت ۱ درصد وزنی) اضافه شد و بدین ترتیب نمونه‌های تیمار شده جهت مراحل بعدی تحقیق آماده شد. آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل شامل چهار نوع رس (ENMM، NMM، MM) و خاک مزرعه بدون تیمار به عنوان شاهد (C) در پنج زمان (۱، ۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) با سه تکرار انجام شد. نمونه‌های تهیه شده به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوباسیون شد. یک نمونه خاک نیز بطور جداگانه سترون شد و با علامت اختصاری S نام‌گذاری شد، سپس با انواع رسی‌های آلی شده تیمار و در زمان‌های تعیین شده در سه تکرار اندازه‌گیری در نمونه‌ها انجام شد. نتایج حاصل با نرم‌افزار MINITAB مورد آنالیز قرار گرفت. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح $0/05$ مقایسه شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel XP استفاده گردید.

اندازه‌گیری آنزیم‌ها

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز ۵ گرم از هر نمونه خاک را در یک بالن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته، $0/2$ میلی‌لیتر تولون و ۹ میلی‌لیتر تریس اضافه و چند ثانیه هم زده شد. سپس یک میلی‌لیتر محلول اوره $0/2$ مولار) به عنوان سوبسترا بصورت قطره قطره اضافه و چرخانده و کاملاً مخلوط شد. درب بالن را بسته به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس بلافاصله ۳۰ میلی‌لیتر محلول کلرید پتاسیم دو مولار اضافه و در همزن دورانی با سرعت ۲۰۰ rpm به مدت یک ساعت همزده و حجم نهایی محلول به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و در نهایت از کاغذ صافی عبور داده شد. آمونیوم آزاد شده در اثر فعالیت آنزیم اوره‌آز بوسیله کلرید پتاسیم استخراج شد (Kandeler et al., 2011). تیمار شاهد نیز در نظر گرفته شد، این تیمار قبل از انکوباسیون سوبسترا دریافت نکرد. میزان نیتروژن آمونیومی استخراج شده با روش ایندوفنل بلو اندازه‌گیری شد (Bashour & Sayegh, 2007) و در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس میکروگرم آمونیوم آزاد شده به ازای یک گرم خاک خشک پس از دو ساعت انکوباسیون گزارش شد.

برای اندازه‌گیری آنزیم فسفاتاز قلیایی به تعداد نمونه‌ها ارلن ۵۰ میلی‌لیتری در نظر گرفته شد. یک گرم از هر نمونه خاک را در ارلن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و $0/2$ میلی‌لیتر تولون، ۴ میلی‌لیتر MUB کاری و ۱ میلی‌لیتر محلول فسفات پارانیتروفنل اضافه شد. ارلن‌ها بصورت دورانی چند ثانیه چرخانده تا اجزای آن کاملاً مخلوط شدند. سرپوش ظرف را گذاشته و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان دو ساعت در پوش ظرف برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر محلول کلرید کلسیم $0/5$ مولار و ۴ میلی‌لیتر محلول

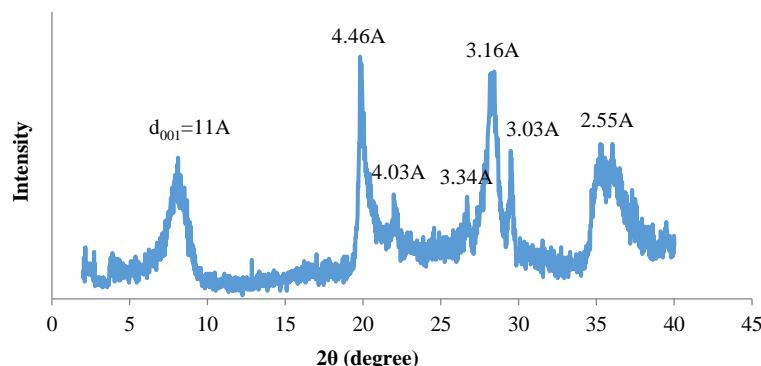
سود ۰/۵ مولار اضافه و به مدت چند ثانیه تکان داده شد. حال به نمونه شاهد ۱ میلی لیتر فسفات پارانیتر و فنل اضافه شد. در تیمار شاهد قبل از انکوباسیون نایستی ۱ میلی لیتر محلول پارانیتر و فنل اضافه شود. سوسپانسیون حاصل با دو لایه کاغذ واتمن صاف شد. در نمونه‌ها و استانداردها مقدار جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. غلظت پارانیتر و فنل در نمونه‌ها و شاهد از منحنی واسنجی محاسبه شد. فعالیت آنزیم فسفاتاز بر حسب میکروگرم پارانیتر و فنل به ازای یک گرم خاک خشک پس از دو ساعت انکوباسیون گزارش شد.

برای اندازه‌گیری آنزیم دهیدروژناز ۳ گرم از هر نمونه خاک برداشته شد. به نمونه‌ها ۳ میلی لیتر آب و ۳ میلی لیتر تری فنیل فورمازان اضافه شد، محتوای لوله‌ها همزده و بعد از گذاشتن درپوش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط تاریک انکوباسیون شد. برای استخراج تری فنیل فورمازان ۱۰ میلی لیتر متانول به همه لوله‌ها اضافه و به مدت یک ساعت در محیط تاریک روی شیکر قرار داده شد. در این مرحله به نمونه شاهد تری فنیل فورمازان اضافه شد. نمونه‌ها از کاغذ صافی عبور داده و در بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. آنقدر متانول به نمونه‌ها اضافه شد تا رنگ نمونه‌ها به قرمز متمایل شد. حجم نهایی نمونه‌ها با متانول به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. مقدار جذب نور در عصاره‌ها و استانداردها حداکثر تا یک ساعت در طول موج ۴۸۵ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. غلظت تری فنیل فورمازان در نمونه‌ها و شاهد از منحنی واسنجی محاسبه شد. فعالیت آنزیم دهیدروژناز بر حسب میکروگرم تری فنیل فورمازان به ازای یک گرم خاک خشک در مدت یک ساعت انکوباسیون گزارش شد (Alotaibi & Schoenau, 2011).

نتایج و بحث

خصوصیات رس‌های تهیه شده

دیفرآکتوگرام اشعه ایکس (XRD) در شکل ۴ مربوط به رس مونتوریلونیت (MM) است و با توجه به شکل فاصله بین لایه‌ای پیک رده اول (d_{001}) این رس ۱۱ آنگستروم است.



شکل ۴- دیفرآکتوگرام اشعه ایکس رس مونتوریلونیت سدیم‌دار (MM)

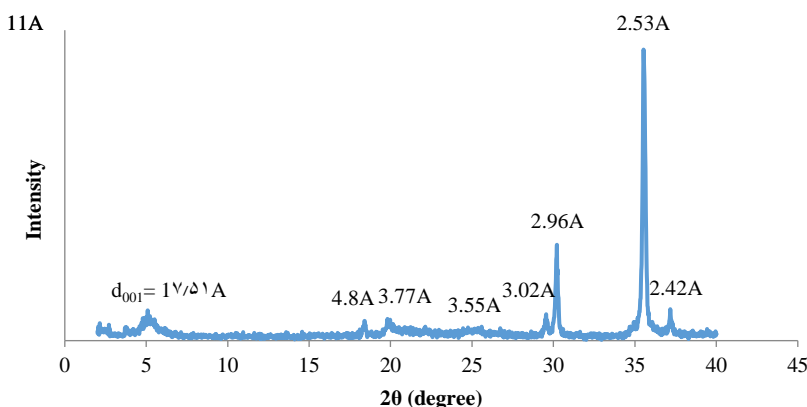
با توجه به دیفرآکتوگرام اشعه ایکس (شکل ۵) مشاهده شد که رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) دارای فاصله بین لایه‌ای پیک رده اول (d_{001}) ۱۷/۵۱ آنگستروم است اما شدت پیک به علت حضور نانوذرات به شدت کاهش یافته است. در دیفرآکتوگرام اشعه ایکس رس تغییر یافته با مجموع سورفکتانت اگزوپلی‌ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) هم در موقعیت ۲θ کمتر از ۱۰ درجه پیک قوی مشاهده نشد (شکل ۶). با استفاده از نرم‌افزار (X'pert) می‌توان فاصله بین لایه‌ای صفحات مختلف رس را در دیفرآکتوگرام اشعه ایکس رس بدست آورد. نرم افزار فاصله بین لایه‌ای پیک رده اول (d_{001}) رس تغییر یافته با سورفکتانت اگزوپلی‌ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) را ۱۷/۵۲ آنگستروم نشان داد (شکل ۶). با مقایسه دیفرآکتوگرام اشعه ایکس مشاهده شد که با ورود نانوذرات به سطح رس شدت پیک‌ها کاهش چشمگیری پیدا کرده است، که برای این کاهش پیک دلایل احتمالی مختلفی وجود دارد. از جمله به دلیل ریز بودن فوق‌العاده نانوذرات مگنتیت (۴۳ نانومتر) و قرارگیری این نانوذرات ریز در فاصله بین لایه‌ای رس سبب کاهش نیروهای دافعه لایه‌های رس شده در نتیجه شدت پیک‌های مربوط به رس در دیفرآکتوگرام اشعه ایکس کم شده است. که برای حل این مشکل بهتر بود اشباع نمونه‌ها با اتیلن گلیکول صورت گیرد زیرا ملکول‌های قطبی اتیلن گلیکول در فضاهای بین لایه‌ای مونتوریلونیت وارد شده و سبب افزایش



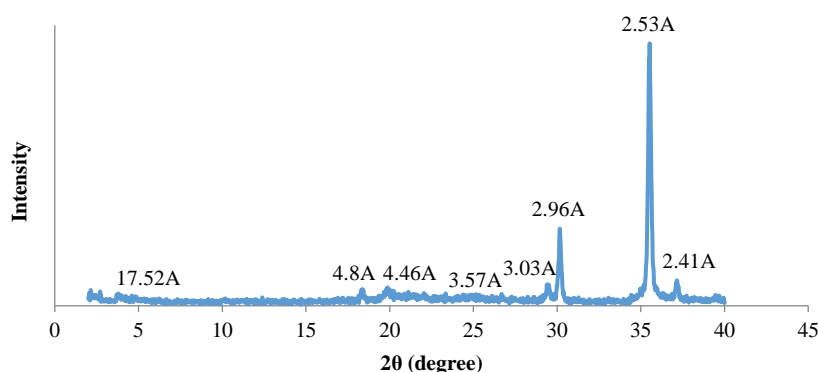
فاصله بین لایه‌ای پیک رده اول رس (d_{001}) می‌شوند، در اثر افزایش فاصله بین لایه‌ای اندازه بلورهای مونتموریلونیت بزرگتر شده و در نتیجه شدت پیک مربوط در دیفراکتوگرام اشعه ایکس افزایش می‌یابد. از طرفی احتمالاً نحوه پراکنش نانوذرات مگنتیت در ساختار رس به عنوان بستر نگهدارنده و همچنین شکل‌گیری نانوذرات به نوعی بوده که جهت‌های صفحات نامنظم شده و در نتیجه باعث کاهش شدید شدت پیک‌های رس شده است. اگر چه در این پژوهش شدت پیک‌ها با ورود نانو ذرات مگنتیت کم شده است اما با توجه به دیفراکتوگرام اشعه ایکس و با استفاده از نرم‌افزار ($X'pert$) فاصله بین لایه‌ای صفحات یکسان با رس مونتموریلونیت بدست آورده شد و در شکل‌های ۵ و ۶ آورده شده است. این فاصله‌های بین لایه‌ای در رس‌های تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) و سورفکتانت اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) با رس مونتموریلونیت (MM) یکسان است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ساختمان کریستالی رس بهم نخورده و فقط شدت پیک‌ها کاهش یافته است. با بررسی دیفراکتوگرام اشعه ایکس در رس‌های تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) و سورفکتانت اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) دو پیک شدید دارای فاصله بین لایه‌ای ۳ آنگستروم و ۲/۵ آنگستروم مشاهده شد که مربوط به پیک اکسید آهن (FeO) است که هم در رس مونتموریلونیت و هم نانوذرات مگنتیت وجود دارد (شکل‌های ۵ و ۶).

تاثیر افزودن نانو ذرات بر فضای بین لایه‌ای رس‌ها توسط برخی از پژوهشگران مورد بررسی قرار گرفته است. Yuan *et al* (2009) نانوکمپوزیتی با رس مونتموریلونیت و نانوذرات مگنتیت تهیه کردند و مشاهده نمودند که فاصله بین لایه‌ای پیک رده اول (d_{001}) رس مونتموریلونیت اولیه ۱۲/۸ آنگستروم بود که با ورود نانوذرات مگنتیت به ۱۵/۸ آنگستروم افزایش یافت. Li & Wu (2010) در مطالعه خود ابتدا رس مونتموریلونیت را با سورفکتانت کاتیونی هگزادسیل تری متیل آمونیوم به رس آلی تبدیل کردند و سپس نانوذرات آهن صفر ظرفیتی را به رس اضافه نمودند و نانوکمپوزیت رس آلی-نانوذرات آهن را تهیه کردند و با بررسی دیفراکتوگرام اشعه ایکس مشاهده نمودند که فاصله بین لایه‌ای رس مونتموریلونیت ۱۴/۸ آنگستروم بود که پس از تغییر به نانوکمپوزیت به ۱۵/۱ آنگستروم افزایش یافت. Wu *et al* (2014) نیز در آزمایشی مشابه و با تغییر رس مونتموریلونیت با هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید و نانو ذرات آهن صفر ظرفیتی افزایش فاصله بین لایه‌ای پیک رده اول رس را تا ۱۵ آنگستروم گزارش کردند.

تاثیر افزودن برخی از انواع اگزوپلی ساکارید بویژه کیتوسان بر فضای بین لایه‌ای رس‌ها توسط برخی از پژوهشگران مورد مطالعه قرار گرفته است. An & Stefan (2007) تاثیر ترکیب کیتوسان (اگزوپلی ساکارید) و رس مونتموریلونیت بر جذب تانیک اسید را مورد بررسی قرار داده و افزایش جذب تانیک اسید بر رس تغییر یافته را گزارش دادند. اگزوپلی ساکاریدها بیوپلیمر طبیعی هستند که همراه با رس مونتموریلونیت ظرفیت بسیار بالایی برای جذب عناصر دارند و دلیل آن وجود گروه‌های عاملی آمین و هیدروکسیل روی زنجیرهای این بیوپلیمر است (An & Stefan, 2007; Assaad *et al*, 2007). ترکیب مونتموریلونیت و اگزوپلی ساکاریدها نقش موثری در سازگاری زیستی، تجزیه‌پذیری بیولوژیکی و فعالیت میکروبی دارد (Hsu *et al*, 2009, 2012; Rao *et al*, 2010). Sharma & Komarneni (2009) گزارش کردند که ترکیب اگزوپلی ساکارید با کانی رسی در کنترل آلودگی‌های محیطی مانند آلاینده‌ها، علف‌کش‌ها و سموم در خاک نیز بسیار موثر است. سورفکتانت‌های آلی نقش مهمی در حفظ آنزیم‌ها از ایموبیلیزه شدن توسط کانی‌های رسی یا ترکیبات هوموسی دارند (Hu & Cao, 2007). در مطالعات دیگر از پلی ساکارید طبیعی کیتوسان برای تثبیت آنزیم‌ها در صنعت غذاسازی استفاده شد (Zappino *et al*, 2015; Benucci *et al*, 2017). همچنین Wicklein *et al* (2011) رس سیپولیت را با سورفکتانت‌های آلی متفاوت به رس آلی آب‌گریز تبدیل کرده و مشاهده کردند که توانایی جذب و نگهداری آنزیم اوره‌آز روی رس‌های آلی بیشتر از رس سیپولیت بود. بطوری که رس سیپولیت ۶۲ درصد توانایی جذب و نگهداری آنزیم اوره‌آز را داشت اما در رس‌های آلی سیپولیت توانایی جذب و نگهداری اوره‌آز تا ۹۷ درصد افزایش نشان داد. در برخی از مطالعات مهندسی آنزیم از رس به عنوان پایه برای کیتوسان استفاده شده زیرا رس‌ها دارای هزینه پایین، توانایی جذب و سطح ویژه بالا می‌باشند (An *et al*, 2015; Bertolino *et al*, 2016). بیشترین رس مورد استفاده در این زمینه مونتموریلونیت و سیپولیت بوده است (Sedaghat *et al*, 2009; Hsu *et al*, 2012; Lewandowska *et al*, 2015). همچنین Ruiz Hitzky *et al* (2008) نیز گزارش کردند که اگزوپلی ساکاریدها نقش عامل کیلیت‌گر را در نانوذرات دارند و نانوذرات در این حالت پایدارتر و برای مدت طولانی باثبات هستند و می‌تواند ذرات ریزتر و با غلظت بسیار پایین را جذب کنند. Cullen *et al* (2011) بیان کردند که استفاده از سورفکتانت‌های آلی اثر سمیت نانوذرات را کاهش می‌دهد. در مطالعات دیگر از اگزوپلی ساکاریدهای طبیعی همراه با نانوذرات در کاهش تنش خشکی استفاده شده است (Jatav & Nirmal, 2013) که این مبحث نیز به نوبه خود باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها می‌شود.



شکل ۵- دیفرآکتوگرام اشعه ایکس رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM)



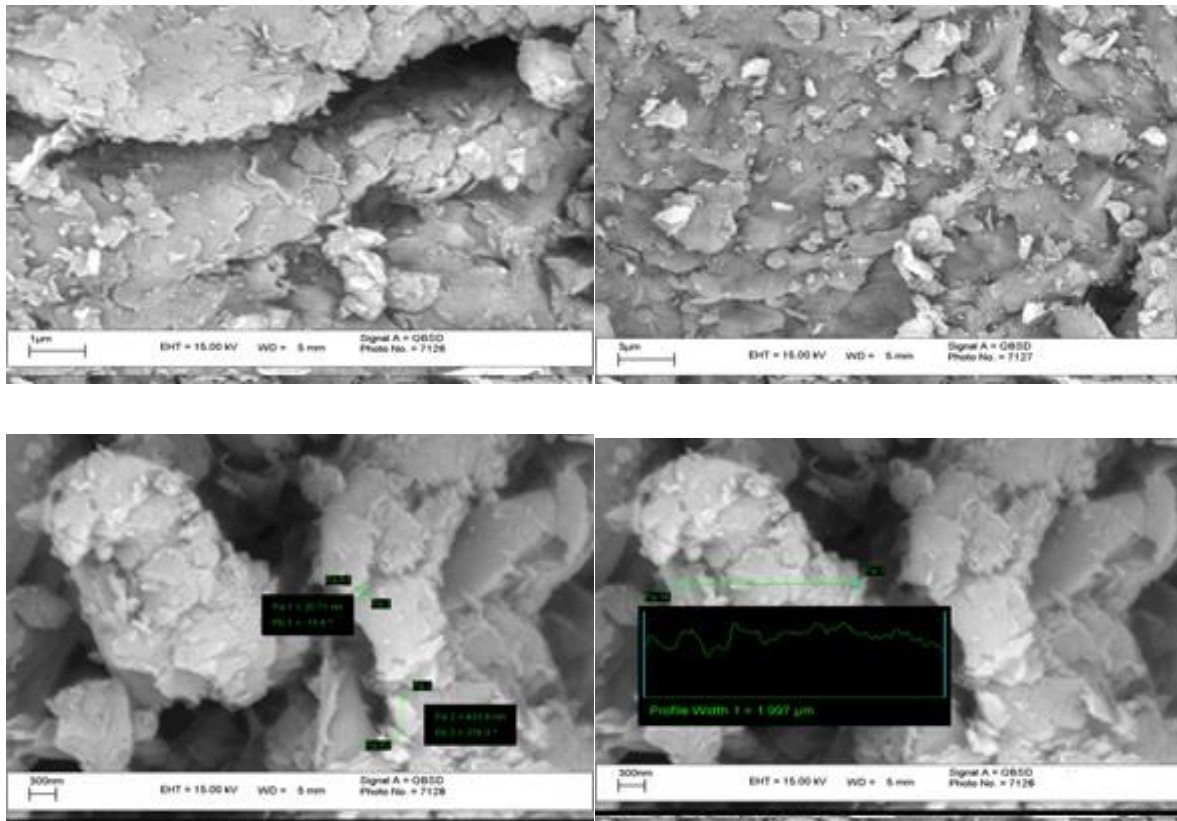
شکل ۶- دیفرآکتوگرام اشعه ایکس رس تغییر یافته با سورفکتانت اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM)

در شکل ۷ مورفولوژی رس مونتموریلونیت سدیم‌دار (MM) در بزرگنمایی‌های مختلف نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود مونتموریلونیت بیشتر حالت توده‌ای داشته و لایه‌های سیلیکاتی در بزرگنمایی زیاد در آن قابل تشخیص نیست. ساختار یکپارچه و کم تخلخل رس در این تصاویر به وضوح قابل مشاهده است.

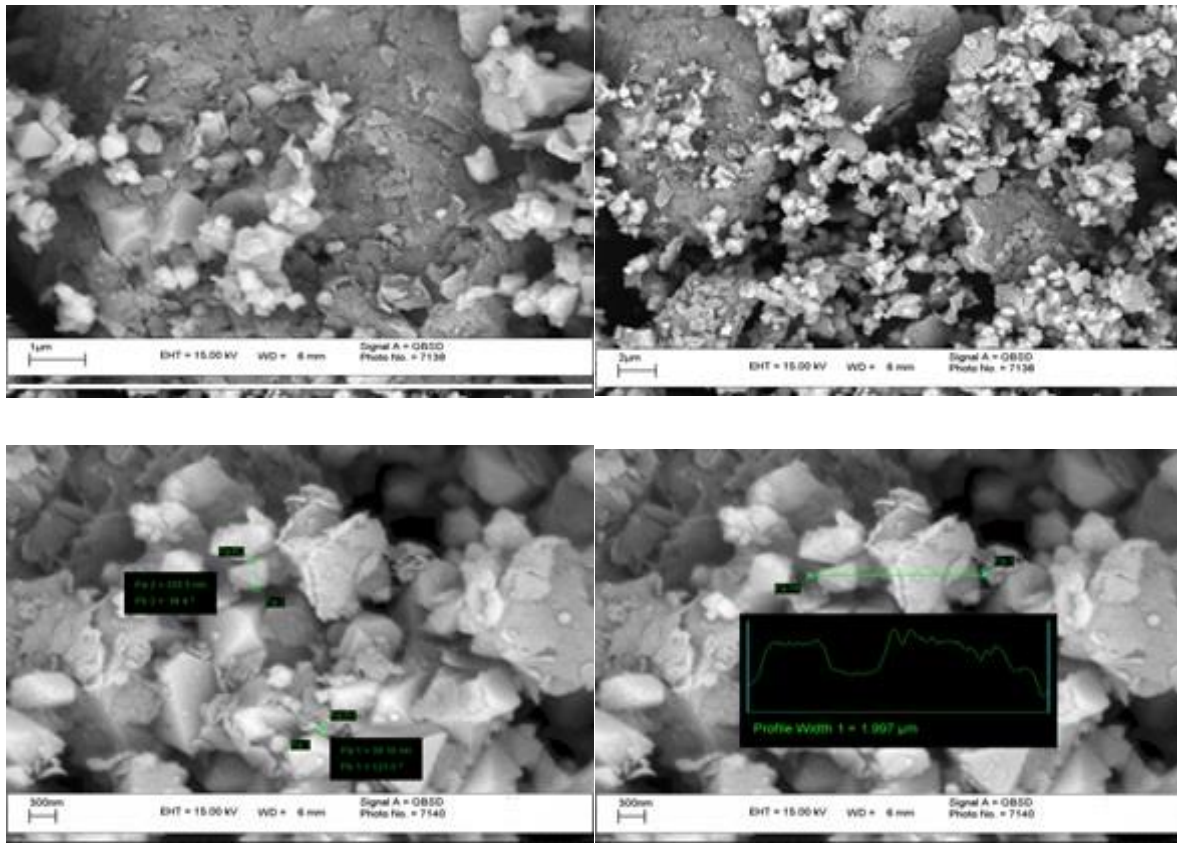
در شکل ۸ مورفولوژی رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) در بزرگنمایی‌های مختلف نشان داده شده است. در این تصاویر بیشتر نانوذرات مگنتیت قابل مشاهده است که ظاهراً در کنار هم تجمع یافته‌اند. نانو ذرات بسیار ناپایدارند و تمایل زیادی به تجمع یا کلوخه شدن دارند که یک نقطه ضعف است. حضور نانوذرات مگنتیت سبب کاهش نیروهای دافعه لایه‌های رس و در نتیجه ایجاد ساختار مجتمع لایه‌های رس شده است.

تصاویر در شکل ۹ مورفولوژی رس تغییر یافته با سورفکتانت اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) در بزرگنمایی‌های مختلف را نشان می‌دهد. در این تصاویر مشاهده شد که پس از تغییر رس مونتموریلونیت به رس آلی تغییر یافته با سورفکتانت اگزوپلی ساکارید، نانوذرات مگنتیت روی لایه‌های متخلخل رس بصورت پراکنده قرار گرفته‌اند. هم اگزوپلی ساکارید و هم نانوذرات باعث افزایش چشم‌گیر سطح روبه نمونه شده است و این افزایش سطح در این تصاویر مشهود است. بنظر می‌رسد که سورفکتانت اگزوپلی ساکارید لایه‌های رس را بطور کامل از هم باز کرده و تخلخل‌های فراوانی در آن ایجاد کرده است و ضخامت لایه‌های رس نانومتری شده است (شکل ۹).

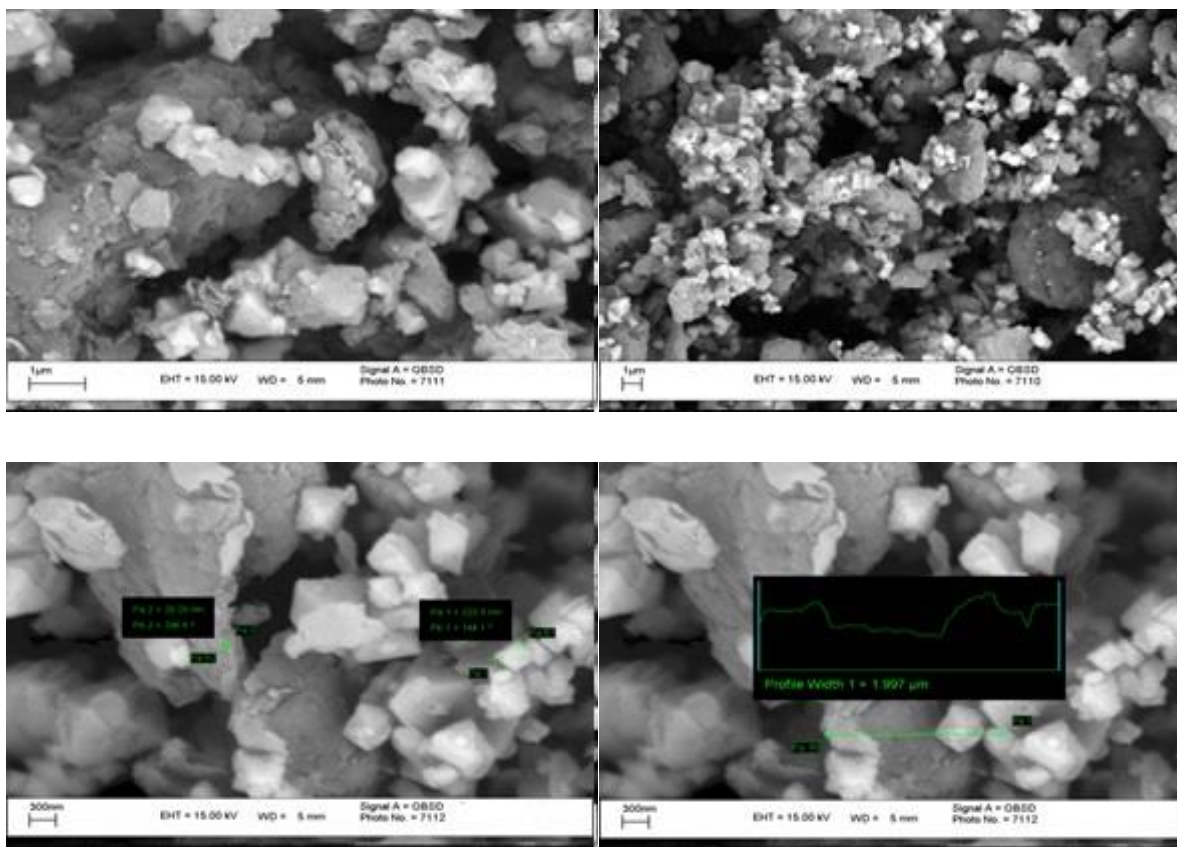
دقت در مورفولوژی رس آلی نشان می‌دهد که نحوه توزیع نانوذرات مگنتیت در سطح و فضای بین لایه‌های رس مونتموریلونیت یکنواخت است و جمعی از نانوذرات در نمونه آلی شده مشاهده نشد که نشان دهنده پراکنش مناسب نانوذرات مگنتیت در بستر رس آلی با سورفکتانت اگزوپلی ساکارید است. اما در شکل ۸ نانوذرات مگنتیت در سطح و فضای بین لایه‌های رس تجمع یافته بودند. در این زمینه Ruiz Hitzky *et al* (2008) گزارش کردند که اگزوپلی ساکاریدها به عنوان کاتالیزور، کیلیت‌گر و عامل ایجاد ثبات در نانوذرات فلزی مانند نانوذرات مگنتیت کاربرد دارند.



شکل ۷- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) رس مونتموریلونیت سدیم دار (MM) در بزرگنمایی های مختلف



شکل ۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) رس تغییر یافته با نانو ذرات مگنتیت (NMM) در بزرگنمایی های مختلف



شکل ۹- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) رس تغییر یافته با سورفکتانت اگزوپولی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) در بزرگنمایی‌های مختلف

تاثیر کاربرد رس‌های تهیه شده بر آنزیم‌های خاک

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز آماری تاثیر تیمار نوع رس، مدت زمان انکوباسیون و تاثیر متقابل آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز و دهیدروژناز در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول‌های ۱، ۲ و ۳).

جدول ۱- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک در حضور انواع رس‌های مونتموریلونیت تغییر یافته در زمان‌های مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع رس	۳	۷۲۱۵/۹*
زمان انکوباسیون	۴	۱۱۲۷/۷*
نوع رس × زمان انکوباسیون	۱۲	۸۹/۰*
خطای آزمایش	۴۰	۷/۸

* در سطح ۵ درصد معنی‌دار است.

جدول ۲- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک در حضور انواع رس‌های مونتموریلونیت تغییر یافته در زمان‌های مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع رس	۳	۴۲۲۹۰*
زمان انکوباسیون	۴	۱۷۱۹۶۲*
نوع رس × زمان انکوباسیون	۱۲	۱۱۳۴*
خطای آزمایش	۴۰	۳۸۲

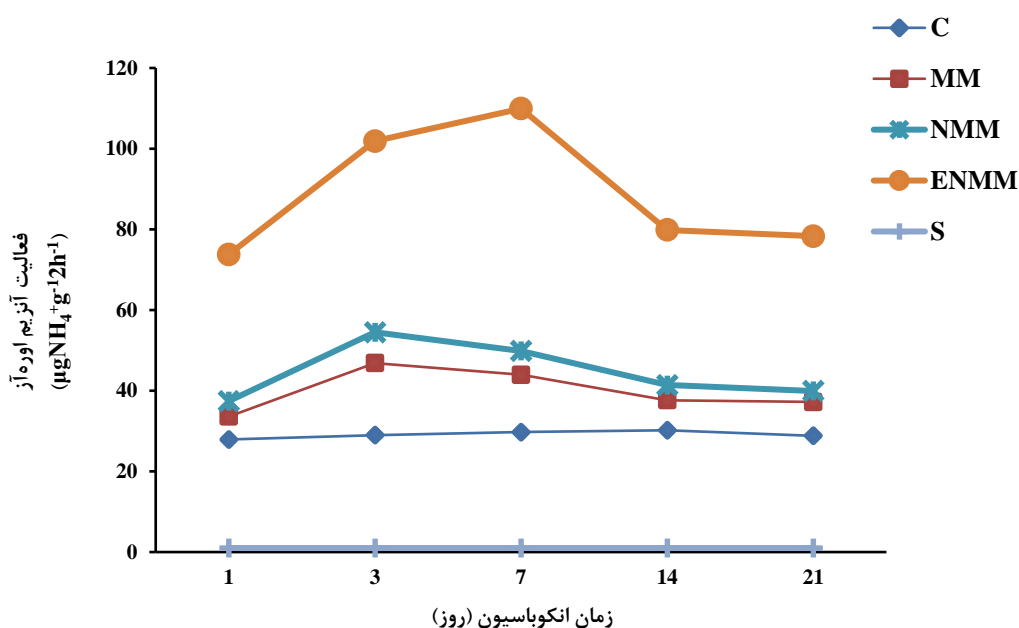
* در سطح ۵ درصد معنی‌دار است.

جدول ۳- تجزیه واریانس فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک در حضور انواع رس‌های مونتموریلونیت تغییر یافته در زمان‌های مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع رس	۳	۶۲/۰۹*
زمان انکوباسیون	۴	۱۶۰/۱۱*
نوع رس × زمان انکوباسیون	۱۲	۱۰/۰۶*
خطای آزمایش	۴۰	۰/۸۸

* در سطح ۵ درصد معنی‌دار است.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز با افزودن رس مونتموریلونیت (MM) به خاک ۱/۴ برابر، رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) ۱/۵ برابر، رس تغییر یافته با اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) ۳ برابر افزایش یافت (شکل ۱۰). بر اساس این پژوهش بیشترین میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز مربوط به خاک تیمار شده با رس تغییر یافته با اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) پس از گذشت ۷ روز انکوباسیون و کمترین میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز مربوط به خاک شاهد (C) در زمان شروع آزمایش بود. با بررسی شکل ۱۰ مشاهده شد که با گذشت زمان در نمونه شاهد (C) بطور تقریبی فعالیت آنزیم اوره‌آز در طول زمان ثابت است. اما در نمونه‌هایی که با رس مونتموریلونیت (MM) و رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) تیمار شده بودند، فعالیت آنزیم‌ها در ابتدا تا ۳ روز افزایش یافته و سپس با شیب کم کاهش مشاهده شد تا اینکه بعد از گذشت ۱۴ روز پس از شروع انکوباسیون این تغییرات روند نسبتاً ثابتی را دنبال کردند. اما در نمونه‌های خاک تیمار شده با رس تغییر یافته با اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) فعالیت آنزیم‌ها در ابتدا تا ۷ روز افزایش یافته و سپس تا روز چهاردهم با شیب تند کاهش یافته و بعد از گذشت ۱۴ روز روند فعالیت آنزیم اوره‌آز ثابت شد (شکل ۱۰). با توجه به نتایج این پژوهش مشاهده شد که در کل تغییرات ایجاد شده در رس مونتموریلونیت باعث افزایش فعالیت این آنزیم در طی ۲۱ روز انکوباسیون شده است. بیشترین شیب کاهش فعالیت این آنزیم پس از ۷ روز به وضوح آشکار است (شکل ۱۰). میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز در رس تغییر یافته با رس تغییر یافته با اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) بطور چشم‌گیری بالاتر از نمونه شاهد (C)، رس مونتموریلونیت (MM) و رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) است (شکل ۱۰). در شکل ۱۰ فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک سترون (S) نیز در حضور خاک تیمار شده با انواع رس مونتموریلونیت با گذشت زمان نشان داده شده است. نتایج نشان داد که در خاک سترون فعالیت آنزیم اوره‌آز در نمونه‌های خاک صفر است که مشخص می‌کند در خاک سترون موجود زنده‌ای وجود نداشته و رس‌های اضافه شده خود نیز هیچ فعالیت آنزیمی نداشتند.

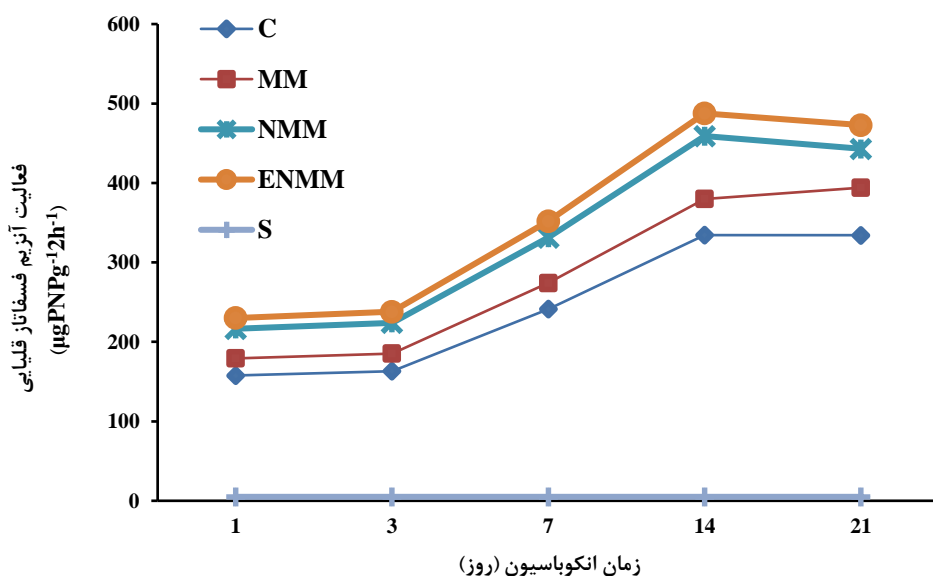


شکل ۱۰- فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک در حضور رس‌های مونتموریلونیت تغییر یافته با گذشت زمان انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

نتایج بدست آمده از بخش فعالیت آنزیم‌ها با تغییرات ایجاد شده در ویژگی‌های رس‌های تغییر یافته، که در بخش اول گزارش داده شد، مطابقت داشت. در این پژوهش با افزودن تیمار رس مونتموریلونیت (MM) به خاک فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد (C) که فقط خاک مزرعه است، افزایش یافت (شکل ۱۰). بطور عمده اتصال آنزیم‌ها و رس‌ها از طریق پیوند کوالانسی است. پژوهشگران دلیل پایداری آنزیم‌ها را با افزودن کانی‌های رسی جذب و نگهداری آنزیم‌ها روی کانی‌های رسی از طریق جذب سطحی، به دام افتادن و هم‌پلیمریزه شدن دانسته‌اند، زیرا در این شرایط آنزیم‌ها از دسترس فلزات سنگین و آنزیم‌های پروتئولیتیک خارج شده و هیدرولیز نمی‌شود (Ozturk *et al.*, 2016; Chapman & Stenzel, 2019).

همچنین با توجه به نتایج پژوهش مشاهده شد که با افزودن تیمار رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) به خاک فعالیت آنزیم نسبت به خاک تیمار شده با رس مونتموریلونیت اولیه (MM) افزایش نشان داد (شکل ۱۰). بدلیل افزایش فاصله بین لایه‌ای رس تغییر یافته با نانو ذرات مگنتیت (NMM) نسبت به رس مونتموریلونیت اولیه (MM)، اندازه کوچک و سطح ویژه زیاد نانوذرات مگنتیت انتظار افزایش فعالیت آنزیم با افزودن این تیمار به خاک نسبت به تیمار رس مونتموریلونیت اولیه (MM) و خاک شاهد (C) وجود داشت (شکل ۱۰). (Cullen *et al* (2011) هم با افزودن نانوذرات آهن صفر ظرفیتی به خاک افزایش در فعالیت آنزیم‌ها را مشاهده کردند. ذرات نانو واکنش‌پذیری بسیار بالا در پایداری، فعالیت آنزیم‌ها و زیست توده میکروبی خاک نقش دارند .

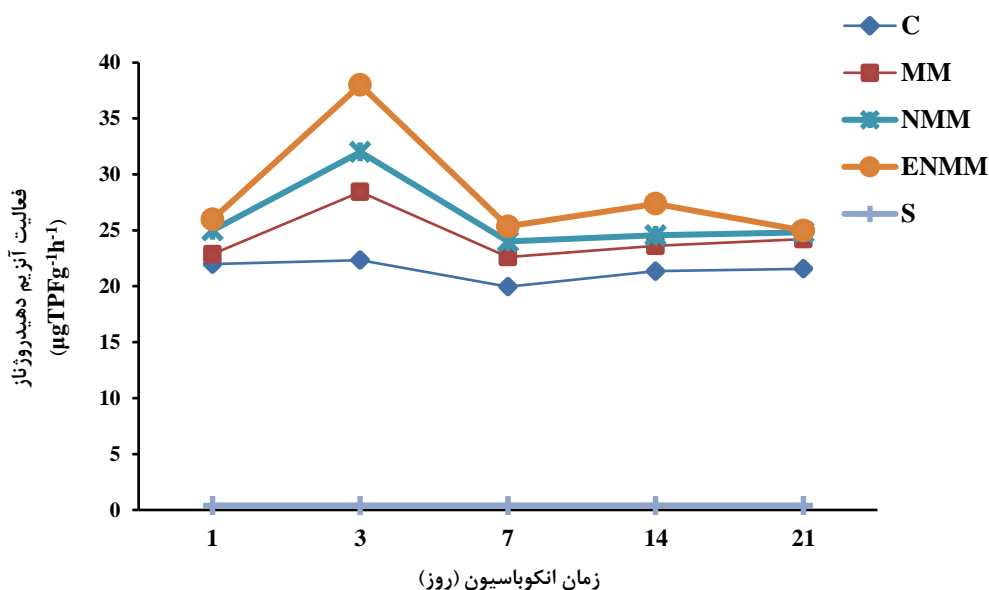
با توجه به نتایج پژوهش (شکل ۱۰) بیشترین میزان فعالیت آنزیم در بین خاک‌های تیمار شده با انواع رس‌های تغییر یافته مربوط به خاک تیمار شده با رس تغییر یافته با اگزوپلی‌ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) است. در خاک تیمار شده با این دو رس افزایش چشم‌گیری در فعالیت آنزیم‌های خاک مشاهده شد. شکل ۱۱ فعالیت آنزیم فسفاتاز را در خاک تیمار شده با رس‌های مونتموریلونیت آلی شده با گذشت زمان نشان می‌دهد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز با افزودن رس مونتموریلونیت (MM) به خاک ۱/۱ برابر، رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) ۱/۳ برابر، رس تغییر یافته با اگزوپلی‌ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) ۱/۵ برابر افزایش نشان داد (شکل ۱۱). تاثیر افزودن تیمار رس‌های تهیه شده به خاک بر فعالیت آنزیم فسفاتاز نسبت به فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز کمتر بود که احتمالاً بدلیل این است که عمده آنزیم‌های فسفاتاز قبل از اضافه شدن تیمارهای رس در خاک در حالت جذب شده قرار داشتند. بیشترین میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز به ترتیب در خاک تیمار شده با رس تغییر یافته با اگزوپلی‌ساکارید و نانو ذرات مگنتیت (ENMM) و سپس رس تغییر یافته با ذرات نانو مگنتیت (NMM) است. از نظر روند زمانی فعالیت این آنزیم از سه روز تا ۱۴ روز پس از انکوباسیون افزایش یافته و سپس ثابت شد که باز دلیل آن احتمالاً جذب سطحی آنزیم فسفاتاز با انواع رس تغییر یافته و ذرات خاک بیشتر و با قدرت بالاتری صورت گرفته و باعث شده است که روند آزادسازی آن کندتر از بقیه آنزیم‌ها باشد. با بررسی شکل ۱۱ مشاهده شد که در همه نمونه‌ها پس از گذشت ۳ روز از انکوباسیون فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی با شیب نسبتاً تند تا ۱۴ روز افزایش یافته، سپس فعالیت آنزیم در طول انکوباسیون تقریباً ثابت شده است.



شکل ۱۱- فعالیت آنزیم فسفاتاز خاک در حضور رس‌های مونتموریلونیت تغییر یافته با گذشت زمان انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

شکل ۱۲ فعالیت آنزیم فسفاتاز را در خاک تیمار شده با رس‌های مونتوریلونیت آلی شده با گذشت زمان نشان می‌دهد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز با اضافه کردن رس مونتوریلونیت (MM) به خاک ۱/۱ برابر، رس تغییر یافته با نانوذرات مگنتیت (NMM) ۱/۲ برابر، رس تغییر یافته با اگزوپلی‌ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) ۱/۳ برابر افزایش نشان داد (شکل ۱۲).

شکل ۱۲ فعالیت این آنزیم را در خاک تیمار شده با انواع رس مونتوریلونیت تغییر یافته با گذشت زمان نشان می‌دهد. بر اساس این پژوهش بیشترین میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز مربوط به خاک تیمار شده با رس تغییر یافته با اگزوپلی‌ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM) پس از گذشت ۳ روز انکوباسیون و کمترین میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز مربوط به خاک شاهد (C) بود (شکل ۱۲). با بررسی شکل ۱۲ مشاهده شد که با گذشت زمان در نمونه شاهد (C) بطور تقریبی فعالیت آنزیم دهیدروژناز در طول زمان ثابت است. اما در نمونه‌هایی که با دو نوع رس مونتوریلونیت تغییر یافته تیمار شده بودند، فعالیت آنزیم‌ها در ابتدا تا ۳ روز با همان شیب تند افزایش یافته و سپس با شیب تند کاهش مشاهده شد تا اینکه بعد از گذشت ۷ روز این تغییرات روند نسبتاً ثابتی را دنبال کردند. (An & Stefan, 2007) تاثیر ترکیب کیتوسان (اگزوپلی‌ساکارید) و رس مونتوریلونیت بر جذب تانیک اسید را مورد بررسی قرار داده و افزایش جذب تانیک اسید بر رس تغییر یافته را گزارش دادند. (Ruiz Hitzky *et al.* 2008) نیز گزارش کردند که اگزوپلی‌ساکاریدها نقش عامل کیلیت‌گر را در نانوذرات دارند و نانوذرات در این حالت پایدارتر و برای مدت طولانی باثبات هستند و می‌تواند ذرات ریزتر و با غلظت بسیار پایین را جذب کنند. همچنین (Cullen *et al.* 2011) بیان کردند که استفاده از سورفکتانت‌های آلی اثر سمیت نانوذرات را کاهش می‌دهد. در مطالعات دیگر از اگزوپلی‌ساکاریدهای طبیعی همراه با نانوذرات در کاهش تنش خشکی استفاده شده است (Jatav & Nirmal, 2013) که این مبحث نیز به نوبه خود باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. بطور کلی در زمینه تاثیر رس‌های آلی تغییر یافته با سورفکتانت اگزوپلی‌ساکارید و مجموع آن با نانوذرات بر فعالیت آنزیم‌ها در محیط خاک مطالعه‌ای صورت نگرفته است.



شکل ۱۲- فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک در حضور رس‌های مونتوریلونیت تغییر یافته با گذشت زمان انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

نتیجه‌گیری

سنجش فعالیت آنزیمی حساس‌ترین شاخص تاثیر فاکتورهای محیطی بر کارکرد میکروبی است، زیرا در چرخه عناصر غذایی موثر است. آنزیم‌های فسفاتاز، دهیدروژناز و اوره‌آز در واقع شاخص‌ها و کاتالیزورهای چرخه‌های بیوشیمیایی و غذایی هستند که در خاک روی می‌دهند و منبع اصلی آنزیم‌های خاک گیاهان و میکروارگانیسم‌های خاک هستند (Finkenbeina *et al.*, 2013). پژوهشگران گزارش کردند که پایداری و فعالیت آنزیم‌ها در خاک به کیفیت بقایای گیاهی، نوع کاربری، pH، فعالیت‌های میکروبی، اقلیم و آلاینده‌ها (Acosta Martinez, 2008; Leinweber *et al.*, 2007; *et al.*), نوع و اندازه مواد افزوده شده به خاک (Patil & *et al.*, 2004) بستگی دارد. آنزیم‌ها در خاک مدت زمان کوتاهی فعالیت دارند زیرا به محض ورود به خاک به سرعت تجزیه یا غیرفعال شده، ساختمان خود را

از دست داده و از بین می‌روند (Frankberger & Tabatabai, 1980; Chapman & Stenzel, 2019). به منظور طول عمر آنزیم‌ها مطالعات زیادی برای افزایش پایداری آن‌ها با استفاده از علم مهندسی آنزیم صورت گرفته است. از جمله اصلاح ساختار آنزیم (Hammer *et al.*, 2018; Arnold, 2018)، تغییر محیط اطراف آنزیم (Lancaster *et al.*, 2018)، بی حرکت کردن آنزیم روی سطوح (Mohamad *et al.*, 2017; Hoarau *et al.*, 2015) و محصور کردن آنزیم‌ها در نانو ذرات (Kuchler *et al.*, 2016; Mazur *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021) بررسی شده است. در علم مهندسی آنزیم یکی از روش‌ها برای پایداری آنزیم‌ها روش مهندسی محیط است که در این روش در محیط اطراف آنزیم بدون تغییر در ساختار آنزیم تغییراتی اعمال می‌شود که فعالیت آنزیم افزایش یابد (Kim *et al.*, 2006; Hegedus & Nagy, 2009; Benucci *et al.*, 2017). بسیاری از محققان قرارگیری آنزیم‌ها بر روی حامل‌ها یا به دام انداختن آنها در روی نانوذرات با هدف محدود کردن حرکت آنزیم و دوری از محیط‌های تهاجمی را مد نظر قرار دادند. که این استراتژی به منظور (۱) حفظ فعالیت آنزیم‌ها، (۲) پایداری طولانی مدت آنزیم‌ها در برابر دما، کم آبی، حلال‌های آلی و pH های تهاجمی (۳) امکان تنظیم و برگشت‌پذیری فعالیت آنزیم‌ها بود. در سال‌های اخیر پژوهشگران آنزیم‌ها را روی نانوذرات تثبیت کرده‌اند (Chapman & Stenzel, 2019). در این مطالعه نیز با افزودن رس‌های آلی شده تحولاتی در محیط پیرامون آنزیم‌های خاک صورت گرفت و باعث تغییراتی در فعالیت این آنزیم‌ها در خاک شد. نتایج پژوهش نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم‌ها در نمونه‌های خاکی بود که با رس تغییر یافته با مجموع سورفکتانت اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت (ENMM)، رس آلی تغییر یافته با نانو ذرات مگنتیت (NMM) و رس مونتموریلونیت اولیه (MM) تیمار شده بودند. با توجه به نتایج مشاهده شد که ایجاد تغییرات با سورفکتانت اگزوپلی ساکارید و نانوذرات مگنتیت باعث افزایش پایداری و فعالیت آنزیم‌ها در محیط خاک در مدت زمان ۲۱ روز انکوباسیون شده است. به نوعی تغییر در محیط اطراف آنزیم‌ها باعث افزایش در پایداری و فعالیت آنزیم‌ها در محیط خاک شد.

"هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد"

REFERENCES

- Acosta Martinez, V., Cruz, L., Sotomayor Ramirez, D., and Perez Alegria, L. (2007). Enzyme activities as affected by soil properties and land use in tropical watershed. *Applied Soil Ecology*, 35, 35-45.
- Alotaibi, K.D., and Schoenau, J.J. (2011). Enzymatic activity and microbial biomass in soil amended with biofuel production byproducts. *Applied Soil Ecology*, 48, 227-235.
- Alshabanat, M., AL-Anazy, M. (2019). Effect of cationic-surfactant-modified Saudi bentonite on the thermal and flammability properties of poly (vinyl alcohol)-based nanocomposite films. *Journal of Taibah University for Science*, 13(1), 360-369.
- An, J.H., and Stefan, D. (2007). Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties. *Applied Clay Science*, 36, 256-264.
- An, N., Zhou, C.H., Zhuang, X.Y., Tong, D.S., and Yu, W.H. (2015). Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. *Applied Clay Science*, 114, 283-296.
- Anakli, D. (2019). Effects of the three types of surfactants on the structure of organo-modified bentonite. *Eskisehir Technical University Journal of Science and Technology A - Applied Sciences and Engineering*, 20, 30-35.
- Arnold, F.H. (2018). Directed evolution: Bringing new chemistry to life. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(16), 4143-4148.
- Arruebo, M., Fernandez Pacheco, R., Irusta, S., Arbiol, J., Ibarra, M.R., and Santamaria, J. (2006). Sustained release of doxorubicin from zeolite-magnetite nanocomposites prepared by mechanical activation. *Nanotechnology*, 17, 4057-4064.
- Assaad, E., Azzouzt, A., Nistor, D., Ursu, A.V., Sajin, T., Miron, D.N., Monette, F., Niquette, P., and Hausler, R. (2007). Metal removal through synergic coagulation-flocculation using an optimized chitosan-montmorillonite system. *Applied Clay Science*, 37, 258-274.
- Bashour, I.I., and Sayegh, A.H. (2007). Methods of analysis for soils of arid and semi arid regions. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.
- Bastida, F.Z.A., Hernandez, H., and Garcia, C. (2008). Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma*, 147, 159-171.
- Benucci, I., Liburdi, K., Cacciotti, I., Lombardelli, C., Zappino, M., Nanni, F., and Esti, M. (2017). Chitosan/clay nanocomposite films as supports for enzyme immobilization: An innovative green approach for winemaking applications. *Food Hydrocolloids*, 74, 124-131.
- Bertolino, V., Cavallaro, G., Lazzara, G., Merli, M., Milioto, S., Parisi, F., and Sciascia, L. (2016). Effect of



- the biopolymer charge and the nanoclay morphology on nanocomposite materials. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 55, 7373-7380.
- Bruce, I.J., Taylor, J., Todd, M., Davies, M.J., Borioni, E., Sangregorio, C., and Sen, T. (2004). Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 284, 145-160.
- Chapman, R., and Stenzel, M.H. (2019). All wrapped up: Stabilization of enzymes within single enzyme nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 141 (7), 2754-2796.
- Chen, G., Hu, Q., Schulez, F., Parak, W.J., Wang, L., Cui, X., Yang, K., Luo, Z., Zang, A., and Fu, Q. (2021). Aqueous-based silica nanoparticles as carriers for catalytically active biomacromolecules. *ACS Applied Nano Materials*, 4 (9), 9060-9067.
- Cullen, L.G., Tilston, E.L., Mitchell, G.R., Collins, C.D., and Shaw, L.J. (2011). Assessing the impact of nano- and micro-scale zerovalent iron particles on soil microbial activities: Particle reactivity interferes with assay conditions and interpretation of genuine microbial effects. *Chemosphere*, 82, 1675-1682.
- Dick, R.P. (2010). Soil enzyme stability as an ecosystem indicator. Project. Oregon State University.
- Finkenbeina, P., Kretschmer, K., Kukab, K., Klotza, S., and Heilmeier, H. (2013). Soil enzyme activities as bioindicators for substrate quality in revegetation of a subtropical coal mining dump. *Soil Biology and Biochemistry*, 56, 87-89.
- Frankenberger, W.T., and Tabatabai, M.A. (1980). Amidase Activity in Soils: II. Kinetic parameters. *Soil Science Society of America Journal*, 44, 532-536.
- Galindo Gonzalez, C., Vicente, J.D., Ramos Tejada, M.M., Lopez, M.T., Gonzalez Caballero, F., and Duran, J.D.G. (2005). Preparation and sedimentation behavior in magnetic fields of magnetite-covered clay particles. *Langmuir*, 21, 4410-4419.
- Gauri, S.S., Mandal, S.M., Mondal, K.C., Dey, S., and Pati, B.R. (2009). Enhanced production and partial characterization of an extracellular polysaccharide from newly isolated *Azotobacter sp.* SSB81. *Bioresource Technology*, 100, 4240-4243.
- Ghosh, S., Chaganti, S.R., and Prakasham, R.S. (2012). Polyaniline nanofiber as a novel immobilization matrix for the anti-leukemia enzyme L-asparaginase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74, 132-137.
- Hammer, S.C., Kubik, G., Watkins, E., Huang, S., Mingos, H., and Arnold, F.H. (2017). Anti markovnikov alkene oxidation by metal-oxo-mediated enzyme catalysis. *Science*, 358, 215-218.
- Hegedus, I., and Nagy, E. (2009). Improvement of chymotrypsin enzyme stability as single enzyme nanoparticles. *Chemical Engineering Science*, 64, 1053-1060.
- Hoarau, M., Badiyan, S., and Marsh, E.N.G. (2017). Immobilized enzymes: understanding enzyme-surface interactions at the molecular level. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15(45), 9539-9551.
- Houch, L.B., Mack, E.J., Hydutsky, B.W., Hershman, J.M., Skluzacek, J.M., and Mallouk, T.E. (2008). Carbothermal synthesis of carbon supported nanoscale zerovalent iron particles for the remediation of hexavalent chromium. *Environmental Science and Technology*, 42, 2600-2605.
- Hsu, S., Wang, M., and Lin, J.J. (2012). Biocompatibility and antimicrobial evaluation of montmorillonite/chitosan nanocomposites. *Applied Clay Science*, 56, 53-62.
- Hsu, S.H., Tseng, H.J., Hung, H.S., Wang, M.C., Hung, C.H., Li, P.R., and Lin, J.J. (2009). Antimicrobial activities and cellular responses to natural silicate clays and derivatives modified by cationic alkylamine salts. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 1, 2556-2564.
- Hu, C., and Cao, Z. (2007). Size and activity of the soil microbial biomass and soil enzyme activity in long term field experiments. *World Journal of Agricultural Sciences*, 1, 63-70.
- Jatav, G.K., and Nirmal, D.E. (2013). Application of nanotechnology in soil-plant system. *An Asian Journal of Soil Science*, 8, 176-184.
- Jiang, L., Liu, P., and Zhao, S. (2015). Magnetic ATP/ FA/ Poly (AA-co-AM) Ternary nanocomposite microgel as selective adsorbent for removal of heavy metals from wastewater. *colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 470, 31-38.
- Jin, S., Bum, C.P., Ham, W.S., Pan, L., and Kim, Y.K. (2017). Effect of the magnetic core size of amino-functionalized Fe₃O₄ mesoporous SiO₂ core-shell nanoparticles on the removal of heavy metal ions. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspect*, 531, 133-140.
- Johnatan, D., Castro-Castro, J.D., Macias-Quiroga, I.F., and Sanabria-Gonzalez, N.R. (2020). Adsorption of Cr (VI) in Aqueous Solution Using a Surfactant-Modified Bentonite. *The Scientific World Journal*, 9

pages, <https://doi.org/10.1155/2020/3628163>.

- Kandeler, E., Poll, C., Frankenberger, W.T., and Tabatabai, M.A. (2011). Nitrogen Cycle Enzymes. In: Dick R.P. (ed.). *Methods of soil enzymology*. p. 211-245. Soil Science Society of America. Madison.
- Karimi, B., Tavakolian, M., Mansouri, F., and Vali, H. (2019). Nanopalladium on magnetic ionic nanoparticle network (MINN) as an efficient and recyclable catalyst with high ionic density and dispersibility. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7, 3811-3823.
- Kim, J., Grate, J.W., and Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, 61, 1017-1026.
- Kuchler, A., Yoshimoto, M., Luginbuhl, S., Mavelli, F., and Walde, P. (2016). Enzymatic reactions in confined environments. *Nature Nanotechnology*, 11, 409.
- Lancaster, L., Abdallah, W., Banta, S., and Wheeldon, I. (2018). Engineering enzyme microenvironments for enhanced biocatalysis. *Chemical Society Reviews*, 47(14), 5177-5186.
- Leinweber, P., Jandl, G., Baum, C., Eckhardt, K.U., and Kandeler, E. (2008). Stability and composition of soil organic matter control respiration and soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1496-1505.
- Lewandowska, K., Sionkowska, A., Furtos, G., Grabska, S., and Michalska, M. (2015). Structure and interactions in chitosan composites. *Key Engineering Materials*, 672, 257-260.
- Li, S. and Wu, P. (2010). Characterization of sodium dodecyl sulfate modified iron pillared montmorillonite and its application for the removal of aqueous Cu (II) and Co (II). *Journal of Hazardous Materials*, 173, 62-70.
- Mazur, F., Bally, M., Stadler, B., and Chandrawati, R. (2017). Liposomes and lipid bilayers in biosensors. *Advances in colloid and interface science*, 249, 88-99.
- Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., and Wahab, R.A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 29(2), 205-220.
- Monvisade, P., and Siriphannon, P. (2009). Chitosan intercalated montmorillonite: Preparation, characterization and cationic dye adsorption. *Applied Clay Science*, 42, 427-431.
- Nabati, F., Habibi Rezaei, M., Amanlou, M., and Moosavi Movahedi, A.A. (2011). Dioxane enhanced immobilization of urease on alkyl modified nano porous silica using reversible denaturation approach. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70, 17-22.
- Novakova, A.A., Lanchinskaya, V.Y., Volkov, A.V., Gendler, T.S., Kiseleva, T.Y., Moskvina, M.A., and Zezin, S.B. (2003). Magnetic properties of polymer nanocomposites containing iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 258, 354-357.
- Nurmi, J.T., Tratnyek, P.G., Sarathy, V., Baer, D.R., Amonette, J.E., Pecher, K., Wang, C., Linehan, J.C., Matson, D.W., Penn, R.L., and Driessen, M.D. (2005). Characterization and properties of metallic iron nanoparticles: spectroscopy, electrochemistry, and kinetics. *Environmental Science and Technology*, 39, 1221-1230.
- Ozturk, H., Pollet, E., Phalip, V., Guvenilir, Y., Averous, L. (2016). Nanoclays for Lipase Immobilization: Biocatalyst Characterization and Activity in Polyester Synthesis. *Polymers*, 416, 1-17.
- Patil, A.J., Muthusamy, E., and Mann, S. (2004). Synthesis and self-assembly of organoclay wrapped biomolecules. *Angewandte Chemie*, 116, 5036-5041.
- Rao, M.S., Kanatt, S.R., Chawla, S.P., and Sharma, A. (2010). Chitosan and guar gum composite films: preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 82, 1243-1247.
- Rudnicki, P., Hubicki, Z., and Kolodynska, D. (2014). Evaluation of heavy metal ions removal from acidic waste water streams. *Chemical Engineering Journal*, 252, 362-373.
- Ruiz Hitzky, E., Darder, M., and Arona, P. (2008). *Inorganic Hybrid Nanomaterials*. In: Ruiz Hitzky, E., Ariga, K., and Lvov, Y.M. (eds.), WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim.
- Sedaghat, M.E., Ghiaci, M., Aghaei, H., and Soleimanian Z.S. (2009). Enzyme immobilization. Part 4. Immobilization of alkaline phosphatase on Na-sepiolite and modified sepiolite. *Applied Clay Science*, 46, 131-135.
- Sharma, S., and Komarneni, S. (2009). Synthesis and characterization of synthetic micabionanocomposites. *Applied Clay Science*, 42, 553-558.
- Silva, C., Martins, M., Jing, S., and Fu, J. (2018). Cavaco-paulo, A., practical insights on enzyme stabilization. *Critical reviews in biotechnology*, 38(3), 335-350.
- Theerdhala, S., Bahadur, D., Vitta, S., Perkas, N., Zhong, Z., and Gedanken, A. (2010). Sonochemical stabilization of ultrafine colloidal biocompatible magnetite nanoparticles using amino acid, L-arginine,



- for possible bio applications. *Ultrasonic Sonochemistry*, 17, 730-737.
- Wicklein, B., Darder, M., Aranda, P., and Ruiz Hitzky, E. (2011). Phospholipid sepiolite biomimetic interfaces for the immobilization of enzymes. *ACS Applied Materials Interfaces*, 3, 4339-4348.
- Wu, L., Liao, L., Lv, G., Qin, F., and Li, Z. (2014). Microstructure and process of intercalation of imidazolium ionic liquids into montmorillonite. *Chemical Engineering Journal*, 236, 306-313.
- Yu, B.Y., and Kowak, S.Y. (2010). Assembly of magnetite nanocrystals into spherical mesoporous aggregates with a 3-D wormhole-like pore structure. *Journal of Materials Chemistry*, 38, 8320-8328.
- Yuan, P., Fan, M., Yang, D., He, H., Liu, D., Yuanc, A., Zhu, J.X., and Chen, T.H. (2009). Montmorillonite-supported magnetite nanoparticles for the removal of hexavalent chromium [Cr (VI)] from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 821-829.
- Zappino, M., Cacciotti, I., Benucci, I., Nanni, F., Liburdi, K., and Valentini, F. (2015). Bromelain immobilization on microbial and animal source chitosan films, plasticized with glycerol, for application in wine like medium: Microstructural, mechanical and catalytic characterizations. *Food Hydrocolloids*, 45, 41-47.
- Zhang, L., He, R., and Gu, H.C. (2006). Synthesis and kinetic shape and size evolution of magnetite nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 41, 260-267.
- Zhu, L.Z., Zhu, R.L., Xu, L.H., and Ruan, X. (2007). Influence of clay charge densities and surfactant loading amount on the microstructure of CTMA-montmorillonite hybrids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 304, 41-48.