

НАНОТОРОВЕ

Съдържание

НАНОТОРОВЕ.....	1
Стратегическа роля на нанотехнологиите за производство на торове - потенциал и ограничения.....	1
Наноторове или конвенционални торове - формулиране и доставяне на наноторове....	3
Биосинтеза на наночастици от микроорганизми	9
Медирана синтеза на метални наночастици от микроорганизми	9
Микробни наноформати: проучване на потенциала за наноземеделие.....	12
Поглъщане на наноторове, транслокация и поведение в растенията	13
Ефект на наноторовете върху физиологията и метаболизма на растенията	15
Етични въпроси, свързани с безопасността на наноторовете	16
ГЕНО ИНЖЕНЕРНИ МИКРООРГАНИЗМИ КАТО БИОТОРОВЕ.....	18
Генетично модифицирани бактерии за селскостопански цели	18
Оцеляване на генетично модифицирани бактерии в почвата	18
Влияние върху околната среда на ГММ, инокулирани в почвата	20
Съдба и въздействие на щамовете биофертилизатори - поведение в полеви условия .	21
Генетично модифицирани щамове <i>Azospirillum</i> и <i>Rhizobium</i>	21
ЛИТЕРАТУРА	26

НАНОТОРОВЕ

Стратегическа роля на нанотехнологиите за производство на торове - потенциал и ограничения

Способността на хората за конструиране и манипулиране на материали от нано-областта нараства с огромни темпове през последното десетилетие, поставяйки основите на интердисциплинарната наука нанотехнологии. Наноматериалите имат различно поведение, сравнени със същия материал от не-нано областта, те имат високо съотношение повърхност-обем, висока разтворимост, специфично таргетиране, висока подвижност и ниска токсичност. Те могат да бъдат конструирани така, че да притежават повърхностна реактивност или други желани характеристики – уникално поведение, което може да бъде едновременно полезно и да води до печалба. От Март 2011, над 1300 комерсиално достъпни продукти на пазара съдържат наноматериали. През 2015 г нанотехнологиите са индустрия за 1 милиард долара.

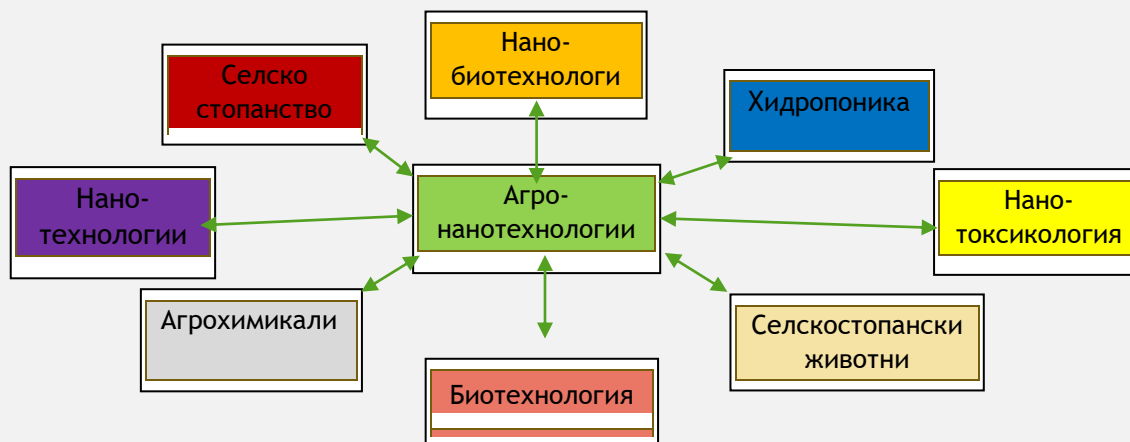
НАНОТОРОВЕ

Според Национална Инициатива за Нанотехнологии (NNI) – нанотехнологичното проучване и развитие е основано на разбирането и създаването на подобрени материали, устройства и системи, които използват възможности от нано-областта. Следвайки дефиницията, дадена от Royal Society, нанотехнологиите включват проектиране (дизайн), характеризиране, производство и приложение на структури, устройства и системи посредством контрол върху формата и обема по нанометричната скала.

Напоследък нанотехнологиите се развиват като шестата технологична революция, след Зелената революция от 1960-те и Биотехнологичната революция от 1990-те години. Нанотехнологиите представляват иновативен научен подход, който включва използването на материали и оборудване, способни да управляват физичните и химичните характеристики на субстанциите на молекулно ниво. В понятието се сливат наука и технология, водещи до революционен пробив в области като електроника, науки за земята, космически технологии и неприродни науки. Потенциалното приложение и ползи от нанотехнологиите са огромни. В наши дни нанотехнологиите прогресивно се изместват от експерименталните към практическите области. Нанотехнологиите обещаваат значително приложение в селскостопанските проучвания при решаването на важни селскостопански проблеми, каквито са детекцията на замърсители, болести по растенията, пестициди и патогени; контролирано доставяне на пестициди, торове и хранителни вещества, както и на генетичен материал; формиране и свързване на почвени структури. В наши дни, когато селскостопанските научни работници се изправят пред такива основни предизвикателства като намалена продукцията, недостиг на хранителни вещества и климатични промени, нанотехнологиите предлагат обещаващи прецизни приложения. Тази иновативна технология включва широки приложения, като контрол на заболяванията по растенията, повишен прием на хранителни вещества, подобрения в растежа на растенията, както и забавено освобождаване на агрохимикали. Интересно е, че популярността на стратегията, базирана на наночастиците нараства в селскостопанския сектор, като резултат на уникалните ѝ възможности, сравнени с тези на биопестицидите. Приложението на нанотехнологиите в селското стопанство (т.н. агро-нанотехнология - Фиг.1), придобива все по-голямо значение, основно поради следните няколко категории:

1. Повишаване на производството и добива,
2. Увеличаване на ефикасността в използването на ресурсите,
3. Минимизиране на продукцията на отпадъци,
4. Специализирани приложения, които включват наноторове и нанопестициди,
5. Базирано на нанотехнологиите третиране на отпадъците от селското стопанство,
6. Наносензори.

НАНОТОРОВЕ



Фигура. 1. Мултидисциплинарна природа на агро-нанотехнологиите.

На дневен ред е налагането на потенциала на нанотехнологиите в устойчивото аграрно управление. Нанотехнологиите заемат много обещаващи позиция в трансформирането на селското стопанство и хранителната продукция. Разработването и развитието на наноустройства и материали може да следва и нови приложения в растителните биотехнологии и селското стопанство. По такъв начин, развитието на торове с контролирано освобождаване на базата на нанотехнологиите става ключов етап от промотирането на екологически приемливо и стабилно селскостопанско производство. Прилагането на наноскала, или на наноконструирани материали като носители за торове, водят до разработване на т.н. „умни торове“, които разкриват нови възможности за повишаване на ефективността на използване на хранителните вещества и регулиране на нови правила за енергийна ефективност.

Наноторове или конвенционални торове - формулиране и доставяне на наноторове

Сериозните темпове на увеличаване на човешката популация през последните 10-15 години налага необходимостта от повишаване на селскостопанската продукция за задоволяване на продоволствените нужди на стотици милиони хора. Повишаването на хранителния дефицит в почвите причинява значителни икономически загуби за фермерите от една страна и значително намаление на хранителните качества на зърното, използвано за храна, от друга. Годишната продукция може да бъде увеличена посредством използването на торове, макар че те имат и допълнителна роля в повишаване на цената на храната, особено след реализирането на високи добиви и вариране на годишната продукция в отговор на използването на торове. Конвенционалните торове обикновено се прилагат посредством пулверизиране или разпръскване на голяма площ.

НАНОТОРОВЕ

Важен фактор, от който зависи методът на апликиране е реалната крайна концентрация на торовете в растенията. Конвенционалните торове предлагат хранителни вещества в химична форма, която не е напълно усвояема от растенията. В допълнение, превръщането на тези химикали в неразтворима форма в почвата е причина за много ниската степен на оползотворяване на повечето макронутриенти. Концентрацията, много по-ниска от желаната минимална такава, достига мястото на свързване посредством филтриране на химикалите, струпване, оттичане, изпаряване, хидролиза от почвената влага, както и посредством фотолитично и микробно разграждане. Оценено е, че около 40-70 % от азотното, 80-90 % от фосфорното и 50-90 % от калиевото съдържание на прилаганите торове се губи в средата и никога не достига до растението. Тези проблеми налагат повторната употреба на торове. Според Международна Асоциация на Торовата Индустрия (IFIA), световната консумация на торове стремително нараства през периода 2009-2010 и 2010-2011 с темпове на растеж от 5-6 %. Изчислено е, че световната консумация на торове ще достигне 192.8 Mt през 2016-2017. Повтарящата се употреба на свой ред влияе неблагоприятно върху присъщия хранителен баланс на почвата и води до замърсяване на околната среда, засягащо нормалната флора и фауна. Съобщава се, че излишната употреба на торове увеличава устойчивостта на патогени и вредители, намалява микрофлората в почвата, намалява фиксирането на азота, допринася за биоакмулирането на пестициди и унищожават местообитанията на птиците. Този порочен кръг причинява устойчиви икономически загуби.

Добре известно е, че добивите на много култури са започнали да спадат в резултат на небалансирано торене и намаляване на почвеното органично вещество. Освен това, прекомерното използване на азотни и фосфорни торове оказва влияние върху подземните води и води до еутрофикация във водните екосистеми. Останалите минерали могат да се излугват или да изтекат, да се задържат в почвата или да допринесат за замърсяването на въздуха. Като се имат предвид тези факти, широкомащабното приложение на химически торове за повишаване на производителността на реколтата не е приемлив вариант за устойчивост, особено в дългосрочна перспектива. Въпреки, че конвенционалните торове увеличават производството на растителни култури, те нарушават минералния баланс на почвата и намаляват почвеното плодородие. В допълнение към непоправимите щети, които прекомерната употреба на химически торове оказва върху структурата на почвата и минералните цикли, тя разваля почвената микрофлора, растенията и следователно хранителните вериги в екосистемите, което води до наследствени мутации в бъдещите поколения потребители. Поради това е налице спешна необходимост от оптимизиране на използването на химическото торене, за да се удовлетворят нуждите на култури от хранителни вещества и да се сведе до минимум риска от замърсяване на околната среда. Съответно, много важно е да се разработят интелигентни материали, които да могат систематично да отделят химикали за специфични целеви места в растенията, които биха могли да бъдат полезни при контрола на хранителния дефицит в селското стопанство, като същевременно запазят естествената структура на почвата и допринесат за чиста околна среда. Прилагането на наноторовете е обещаваща алтернатива в този контекст.

НАНОТОРОВЕ

Наноторът се отнася до продукт в наномасщаб, който доставя хранителни вещества на културите. Технологията за производство на наноторове е съвременна иновация. Заместването на традиционните методи за прилагане на торове с наноторове е подход за освобождаване на хранителните вещества в почвата, както постепенно, така и по контролиран начин. Наноторовете показват контролирано освобождаване на агрохимикали чрез целенасочено доставяне, намаляване на токсичността и повишено усвояване на хранителни вещества от доставените торове. Те притежават уникални характеристики, които повишават производителността на растенията по отношение на УВ абсорбция, увеличаване на производството, повишаване на фотосинтезата и значително разширяване на повърхността на листата. Освен това контролираното освобождаване на хранителни вещества допринася за предотвратяването на еутрофикацията и замърсяването на водните ресурси.

При наноторовете хранителните вещества могат да бъдат капсулирани в наноматериали, покрити с тънък защитен филм или доставени като емулсии или наночастици. Има много примери за положителен ефект при прилагане на наноторове. Така например, третирането на царевица с наночастици от TiO_2 има значителен ефект върху растежа на културата, докато ефектът от традиционно третиране с TiO_2 е незначителен. Титаниевите наночастици увеличават абсорбцията на светлина и предаването на фотоенергията. В друг експеримент, съединение от SiO_2 и TiO_2 наночастици увеличава активността на ензима нитрат-редуктаза в соя и усилва капацитета за абсорбция на растенията, което прави използването на вода и тор по-ефективно. Наноорганичният железен хелатен тор се оказва екологично устойчив. Положителният ефект от поглъщането и проникването на наночастици от ZnO_2 върху листата на домати растения подкрепя тяхната потенциална употреба като бъдещ нанотор. Наноторовете, които осигуряват бавно, целенасочено и ефективно освобождаване, имат потенциал да повишат ефективността на усвояването на хранителните вещества. Създадените наночастици са полезни за смекчаване на хроничния проблем със задържането на влага в сухите почви и за подобряване на растителната продукция чрез увеличаване наличието на хранителни вещества в ризосферата. Покриването и свързването на наночастиците помага да се регулира отделянето на хранителни вещества от капсулата за тор. Прилагането на нано-композит, състоящ се от азот, фосфор, калий, микроелементи, маноза и аминокиселини, повишава поглъщането и използването на хранителни вещества от зърнени култури. За контролирано освобождаване на химични съединения, които действат като регулатори на растежа на растенията, са използвани натриеви двукомпонентни нано-композити от Zn-Al . Нанопорестият зеолит на базата на азотни торове може да бъде използван като алтернативна стратегия за подобряване на ефективността на използването на азот в системите за растителна продукция. Установено е, че въглеродните нанотръбички проникват в семена от домати и оказват влияние върху кълняемостта и скоростта на растежа им. Аналитичните методи показват, че въглеродните нанотръбички проникват в плътната семенна обвивка и поддържат поглъщането на вода вътре в семената.

НАНОТОРОВЕ

Тези факти подкрепят твърдението, че торовете, базирани на нанотехнологиите, имат потенциал да надминат конвенционалните торове, следвайки няколко важни показателя (както е показано в Таблица 1).

Таблица 1. Конвенционални торове спрямо нано-торове

Показател	Наноторове	Химически торове
Разтворимост	Висока	Ниска
Диспергиране на минерални хранителни вещества	Подобрено диспергиране на неразтворими хранителни вещества	Ниска разтворимост поради големия размер на частиците
Почвена адсорбция и азот-фиксация	Намалена	Висока
Биологична наличност	Висока	Ниска
Ефикасност на поглъщането на хранителни вещества	Повишена ефикасност на поглъщане; спестяване на ресурси	Конвенционалните торове не са налични в кореновата система и ефикасността на поглъщане на хранителни вещества е ниска
Контролирано освобождаване	Прецизно контролирани скорост и начин на освобождаване	Свръхосвобождаване, водещо до токсичност и почвен инбаланс
Ефективност на освобождаването	Повишена ефективност на освобождаване	Използват се от растенията на място и по време на прилагането; останалото количество се превръща в неразтворима форма
Загуба	Намалени загуби от хранителни вещества в тора	Високи загуби поради излугване, дрифт и отмиване

Наноторовете трябва да бъдат формулирани по такъв начин, че да запазят важните си свойства като висока разтворимост, стабилност, ефективност, контролирано във времето освобождаване, повишена целенасочена активност с ефективна концентрация и по-ниска екотоксичност, дължащи се на безопасния и лесен начин на доставяне и отстраняване.

НАНОТОРОВЕ

Наночастиците притежават голям потенциал при целенасочено доставяне на хранителни вещества в живите системи. Наночастиците могат да се зареждат с хранителни вещества най-често по един от следните начини:

- абсорбция на наночастици;
- прикрепване към наночастици, медирани от лиганди;
- капсулиране в нанополимерна обвивка;
- улавяне в наночастици.

Във връзка с тези методи е показано, че суспензии на наночастици на хитозан, съдържащи N, P и K торове, могат да бъдат полезни за земеделски приложения. По същия начин, наночастици от хидроксиапатит (ХА), модифицирани с карбамид, се използват за бавно и продължително освобождаване на азот във времето с растежа на културите. Големият повърхностен слой на ХА улеснява закрепването на голямо количество карбамид на повърхността му и силното взаимодействие между наночастиците от ХА и карбамида допринася за бавното и контролирано освобождаване на последния. Мезопорести наночастици, базирани на полимери, също могат да осигурят ефективна носеща система за агрохимични съединения. Мезопорести силициеви наночастици (150 nm) са докладвани, че улавят уреа и след това я освобождават по контролиран начин в почвата и водата.

Ефективността на наноторовете и тяхното въздействие върху растителните системи се влияе от метода на тяхното приложение. Доставянето на нано-торове в растенията може да се осъществи чрез методите, изброени по-долу. Подходите включват *in vitro* или *in vivo* приложение, както е показано в Таблица 2.

Таблица 2. Режи ми на прилагане на наноторове

<i>In vitro</i> методи	<i>In vivo</i> методи
<p>Аеропоника:</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Принцип: техниката, за първи път приложена през 1992 г. се състои в непрекъснато разпръскване в корените на хранителен разтвор, суспендиран във въздух.➤ Примушества: техниката позволява строг контрол на газовата среда около корените.➤ Недостатъци: техниката изисква високо съдържание на хранителни вещества за поддържане на бърз растеж на	<p>Приложение в почвата:</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Принцип: директно доставяне в почвата;➤ Изисквания: внимателен подбор на времето за циркулиране на тора в почвата; специално внимание към текстурата, солеността на почвата, чувствителността на растенията към засоляване и рН на околната среда. Отицателно заредените почвени частици повлияват адсорбцията на минерални вещества- капацитетът за обмен на аниони на повечето селско- стопански почви е малък в сравнение с

НАНОТОРОВЕ

растенията, поради което приложението ѝ е ограничено.

този за катийони. Сред анионите, NO_3^- остава подвижен в почвения разтвор и податлив на излугване от вода, PO_4^{3-} се свързват с почвени частици, съдържащи Al или Fe, поради факта, че положително заредените $\text{Fe}^{2+/3+}$ и Al^{3+} обменят OH- групи с фосфатите, което води до здраво свързване на последните, чиято подвижност и наличност в почвата може да ограничи растежа на растенията.

➤ Предимства: най-често прилаганият метод за доставяне на хранителни вещества с помощта на химически или органични торове.

Хидропоника:

➤ Принцип: растенията се отглеждат така, че корените им са потопени в течен хранителен разтвор (без почва); методът е въведен през 1937 г. за разтворени неорганични соли, известен е още като „култура в разтвор“ метод.

➤ Изисквания: внимателен подбор на обемите от хранителни разтвори, поддържане на изискуемите количества разтворен кислород и рН.

➤ Предимства: прилагането на поддържащи материали (напр. пясък), които позволяват подаване на свеж хранителен разтвор от единия край и отстраняване на стария от другия край.

➤ Недостатъци: честото атакуване от патогени и високото съдържание на влага могат да причинят бързо увяхване на растенията, засадени в почва.

Листно прилагане

➤ Принцип: течните торове директно се впръскват върху листата, обикновено за снабдяване на растението с микроелементи.

➤ Предимства: намалява периода между прилагане и поемане от растението по време на фазата на бързо нарастване; преодолява проблема с ограниченото поемане на хранителни вещества от почвата; листното прилагане е агрономическо предимство, тъй като в поемането на хранителни вещества участват основно клетки на устицата и листния епидермис.

➤ Недостатъци: необходимост от стандартизиране на протокола за пръскане, за да се избегне увреждане на листата; необходимост от пръскане в определени часове от деня (сутрин и вечер), тъй като устицата са отворени само по това време; възможност за нараняване на растенията, ако тора се прилага в неправилна концентрация.

НАНОТОРОВЕ

Разширяването на технологиите подобри начините за широкомащабно производство на наночастици от физиологично важни метали, които сега се използват като «системи за интелигентно доставяне» за да се подобри формулирането на торове чрез намаляване на загубата на хранителни вещества и увеличаване на поглъщането в растителните клетки. «Системи за интелигентно доставяне» означава комбинация от специално насочени, високо контролирани, дистанционно регулирани и многофункционални характеристики, за да се избегнат биологичните бариери за успешно насочване. Специфичните свойства на наноторовете, т.е. тяхната висока повърхностна площ, сорбционен капацитет и кинетика на контролирано освобождаване към целеви места, ги определят като система за интелигентно доставяне.

Интелигентните торове се превръщат в реалност чрез трансформиране на препарати от конвенционални продукти, с помощта на нанотехнологиите. Наноструктурираният препарат позволява на тора интелигентно да контролира скоростта на освобождаване на хранителните вещества, за да съответства на модела на поглъщане от конкретна култура. Той подобрява разтворимостта и дисперсията на неразтворимите хранителни вещества в почвата, намалява абсорбцията и фиксирането на почвата и увеличава бионаличността, а следователно - ефективността на поглъщане на хранителните вещества.

Биосинтеза на наночастици от микроорганизми

Медирана синтеза на метални наночастици от микроорганизми

През последните години използването на биологични единици се очертава като нов метод за синтеза на наночастици. Биотехнологичната синтеза на наночастици има много предимства, като използването на известни микробни технологии и процеси за увеличаване на добива от биомаса. Това води до икономическа жизнеспособност, възможност за лесно покриване на големи повърхностни площи чрез подходящ растеж на микроби, което е голямо предимство в областта на селското стопанство за по-лесно производство на биоторове.

Недостатъците на конвенционалните методи за получаване на метални наночастици като високи енергийни изисквания и високи производствени разходи, както и производството на токсични странични продукти прави прилагането на такива подходи в голям мащаб много сложно. Използването на микробни клетки (бактерии, гъби, водорасли, вируси и актиномицети) като био-фабрики, осигурява интелигентен алтернативен начин за синтеза на метални наночастици. Биосинтезата на метални наночастици в такива микроорганизми е с ниска цена и представлява екологична технология. Използването на голям брой микроорганизми, както прокариотни така и еукариотни, води до синтезата на широка гама от метални наночастици като златни (Au), сребърни (Ag), оловни (Pb), платинини (Pt), медни (Cu), железни (Fe), кадмиеви (Cd) и метални оксиди като титанов оксид (TiO), цинков оксид (ZnO) и др. Тези микроорганизми

НАНОТОРОВЕ

осигуряват разнообразни условия за производството на наночастици. Изработените наночастици са много полезни, безопасни и екологосъобразни с много приложения. В селското стопанство наночастиците, най-широко използвани като биефектори, са тези от мед (Cu), желязо (Fe), сребро (Ag) и злато (Au). Бъдещите предизвикателства в това отношение включват оптимална биосинтеза на наночастици с определен размер и форма, както и оптимална продължителност на ферментационния процес, за да се повиши тяхната стабилност.

Микробиологичната синтеза е нов подход в производството на наночастици и реализацията на така наречените био-нанофабрики. Основните характеристики на наночастиците са разкрити в изследванията на подготвени наночастици с желана форма и размер.

Основната схема за микробиологична синтеза на метални наночастици е представена на Фиг. 2.

НАНОТОРОВОБЕ



Фиг.2 Основна диаграма за микробиологична синтеза на метални наночастици

Следните параметри играят важна роля в биосинтезата на наночастиците.

1. Биоресурси, използвани за биосинтезата на наночастици: Синтезата на наночастиците се характеризира с избор на най-удачния микроорганизъм по отношение на

НАНОТОРОВЕ

скорост на растеж, производство на ензими и съответните метаболитни пътища. Някои микроорганизми - бактерии, вируси, гъби, дрожди и водорасли, се използват за биосинтеза на метални наночастици и са обект на специални изследвания.

2. Клетъчни метаболити, участващи в биосинтезата: молекули като ензими, протеини, полизахариди и др. действат като редуциращи и стабилизиращи агенти в биосинтезата на наночастиците. Те могат да се използват в процеса като интактни микроорганизми, сурови клетъчни препарати и сурови или пречистени ензими, получени от микроорганизми. Наночастиците се получават главно чрез биоредукция, която се реализира чрез коензими като NADH, NADPH, FAD и др. Установено е, че синтезата на наночастици с помощта на цели гъбни клетки е много по-евтина в сравнение с тази при използване на пречистени ензими от същият гъбен щам.

3. Реакции, улесняващи биосинтезата на наночастиците: процесът на тази биосинтеза се иницира чрез събиране на микробна биомаса, която е свързана с остатъчни хранителни вещества и метаболити, за да се избегнат нежелани странични продукти. По време на процесите, производителността и добивът на продукта са от особен интерес и е необходима оптимизация (например време за производство, рН, температура и т.н.). Процесът на оптимизиране на тези фактори може да повлияе на морфологията на частиците и техните свойства. По този начин изследователите понастоящем насочват изследванията си към подбор на оптимални реакционни условия и на оборудване, използвано в процеса на биоредукция.

4. Инокулум за биосинтезата на наночастиците: Биосинтезата на наночастици зависи от условията на растеж на микробните продуценти, напр. хранителните вещества, рН, температурата и т.н. Тези фактори трябва да бъдат оптимизирани. Те са важни и при използване на цели клетки и сурови ензими. Друг важен параметър за оптимизиране на инокулумите е времето за събиране, затова е необходимо да се следи ензимната активност по време на растежа.

Микробни наноформати: проучване на потенциала за наноземеделие

Наночастиците, синтезирани от микробите, са силно стабилни и биха могли да предложат нетоксичен, рентабилен и екологичен подход за синтеза на химически такива. Тази зелена синтеза има голямо предимство пред химичните методи, които имат токсични ефекти върху околната среда. По този начин използването на важни за земеделието микроорганизми за биосинтезата на наночастиците и тяхната допълнителна роля в земеделието е от голямо значение. Използването на наноформати може да повиши стабилността на биоторовете и биостимулаторите по отношение на изсушаването, топлината и УВ-инактивирането.

НАНОТОРОВЕ

Поглъщане на наноторове, транслокация и поведение в растенията

Поглъщането и съдбата на наноторовете в растенията е нововъзникващо поле на изследователски интерес. Поемането, транслокацията и натрупването на наночастици зависят от самия растителен вид, възрастта и средата на растеж. Тези процеси също са свързани с физикохимичните свойства, функционализирането, стабилността и начина на доставяне на наночастиците. Схематично представяне на пътя на поемане, транслокация и биотрансформация на различни наночастици се предлага от Rico et al. (2011 г.) заедно с възможните начини на клетъчно усвояване в растителната система. Според тази презентация кореновата система извлича и пренася ZnO^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Ag^{2+} и Fe_3O_4 наночастици (НЧ) в листната част на растението, независимо от вида му. В допълнение, съществуват индикатори за зависимост от видовете за пренасяне на НЧ, ZnO НЧ, Al НЧ и Ag НЧ (всички в листата), $Ni(OH)_2$ НЧ в стъблото и CeO_2 НЧ в стъблото и листата. Транслокацията на Fe_3O_4 НЧ в стъблото също е допустима.

Вероятното диференциално взаимодействие на наночастиците върху експозицията в зоната на абсорбция на корена е обобщено в Таблица 3.

Таблица 3. Локализация и взаимодействие на различни наночастици в зоната на абсорбция на корена.

Наночастици	Локализация и взаимодействие
Fe_3O_4 НЧ	Камбий
ZnO НЧ	Ендодермис, метаксилем; Zn^{2+} - в метаксилема
CeO_2 НЧ НЧ	Кортекс
Al НЧ	Кортекс Al^{3+} - в метаксилема
Ag НЧ	Кортекс; Ag^{2+} - в метаксилема
Cu НЧ	Кортекс; Cu^{2+} - в камбия и метаксилема
TiO_2 НЧ	Кортекс
$Ni(OH)_2$ НЧ	Метаксилем

Входът на наночастиците през клетъчната стена зависи от диаметъра на порите на клетъчната стена (5-20 nm). Ето защо наночастиците или агрегатите с наночастици с диаметър по-малък от размера на порите в стените на растителните клетки могат лесно да навлязат през клетъчната стена и да достигнат до плазмената мембрана. Функционализираните наночастици могат да улеснят уголемяването на размера на порите или индуцирането на образуване на нови пори на клетъчни стени, за да се подобри поемането на наночастици. Провеждат се научни дискусии за натрупването на наночастици в растителни клетки, медириани чрез свързване с протеини-носители чрез аквапорин, йонни канали или ендоцитоза. Освен това, наночастиците могат да бъдат транспортирани в

НАНОТОРОВОЕ

растението чрез образуване на комплекси с протеини на мембранни транспортери или коренни ексудати. Други изследвания показват, че наночастиците могат да навлязат в порите на трихомите или „стомата“ на листата. Проучванията за поглъщането и преместването на TiO_2 -ализаринов червен S комплекс в разсада на *Arabidopsis thaliana* показват, че извлечението от корена лепкав материал образува комплекс с пектин хидрогел около корена, който най-вероятно е отговорен за навлизането на комплекса „наночастици“-„багрило“.

Последните проучвания върху механизма на усвояване и транслокация на наночастиците са посветени на използване на флуоресцентно белязани монодиспергирани мезопорести силициеви наночастици, за които е доказано, че проникват в корените чрез симпатичните и апопластични пътища и се преместват през клетъчната тъкан към въздушните части на растенията. Въпреки това, точният механизъм на поглъщане на наночастици от растенията все още не е напълно изяснен.

В цитоплазмата наночастиците се насочват към различни цитоплазмени органели и пречат на различните метаболитни процеси на клетката (Таблица 3). Показано е, че поемането на наночастици от TiO_2 в пшеница включва локализация в паренхимата и съдовите тъкани на корена. Клетъчната интернализация и възходящата транслокация на наночастици от ZnO в *Lolium perenne* протича през кореновите клетки и след това се придвижват до съдовите тъкани.

Поглъщането и натрупването на наночастици от ZnO , когато се прилагат при високи концентрации, се възпрепятства, тъй като наночастиците агломерират, което не позволява навлизането им през порите на клетъчните стени. Освен това, рентгенова абсорбционна спектроскопия на посадъчен материал, обработен с ZnO , показва наличието на Zn^{2+} йони вместо ZnO , което предполага роля на корените в йонизацията на ZnO на повърхността.

Друг клас наночастици, магнетитните НЧ, се държи по начин, по който може да се отчете присъствието им в корена, стъблото и листата, а степента на усвояване на наночастиците е доказано, че се повлиява от вида на средата за растеж. В хидропонична среда е постигнато по-голямо поглъщане в сравнение с наблюдаваното при растения, отглеждани в пясък, докато при растенията в почвата не се наблюдава поглъщане, което може да се дължи на прилепването на магнетитните наночастици към почвата и пясъчните зърна.

Накрая, трябва да се отбележи, че освен някои убедителни изследвания върху наночастици от TiO_2 и ZnO , повечето изследвания за поемане, транслокация и натрупване в растенията се отчитат само до етапа на покълване. Следователно, съдбата на наночастиците в растителната система все още е до голяма степен неизвестна.

Ефект на наноторовете върху физиологията и метаболизма на растенията

Съществуват проучвания, които предполагат, че наночастиците, когато се доставят в контролирана безопасна доза, могат да допринесат за насърчаване растежа и добива на растенията. Например, многоканалните въглеродни наночастици (MWCNP) са показали, че насърчават кълняемостта на семената и растежа на доматиите и подобряват растежа на тютюневите клетки. Същото явление се наблюдава при MWCNT в горчиви растения. Използвайки така наречения индекс на покълване и относителното време на удължаване на корена като еталонни параметри, беше показано, че окислените MWCNP оказват по-добър ефект при по-ниска концентрация от неокислените.

Сравнителните проучвания за оценка на добива на семена и предотвратяване на откъсването на листата в растенията от поречието, третирани с наносребро и сребърен нитрат, показаха, че наносреброто се представя по-добре. Известно е, че растителният хормон етилен играе ключова роля в абсорбцията на листа, а сребърните йони инхибират етилена чрез заместване на медните йони от рецепторите. Когато и двете съединения бяха приложени върху растенията чрез метода на листово разпръскване, беше наблюдавано, че наносреброто е ефективно при по-ниска концентрация от сребърния нитрат. Докладвани са подобни стимулиращи ефекти на биосинтезираните сребърни наночастици върху появата на разсад и различни параметри на растителния растеж на много икономически важни растителни видове.

Извършени са различни изследвания за изясняване на ефекта на наночастиците от ZnO върху растежа на различни растения. По такъв начин е наблюдаван стимулаторен ефект върху растежа на *Vigna radiata* и *Cicer arietinum*. Адсорбцията на наночастици от ZnO върху кореновата повърхност се наблюдава в разсад чрез корелативна светлинна и сканираща електронна микроскопия и адсорбция и индуктивно свързана плазмена / атомна емисионна спектроскопия. Ефектът на наночастиците от ZnO върху физиологията на растителните клетки е изследвана с помощта на клетъчната антиоксидантна система като модел. Прилагайки метода на разпръскване по листата на разсад от нахут е показано, че ниски концентрации на наночастици от ZnO имат положителен ефект върху растежа на растенията и че натрупването на биомаса се е подобрило, което може да се дължи на по-ниските нива на реактивни кислородни видове (ROS) (за които се съди от по-ниското съдържание на малондиалдехид). Полевите експерименти потвърждават, че прилагането на наночастици от ZnO при доза, която е 15 пъти по-ниска от препоръчителната доза ZnSO₄, води до 29,5% по-висок добив от шушулките на нахута.

Сравними положителни ефекти на наночастици от ZnO и CeO₂ са наблюдавани върху качеството на плодовете на *Cucumis sativus*. Прилагането на двете разновидности наночастици води до повишено съдържание на нишесте и евентуално е променен модел на въглехидратната картина.

Открива се стимулиране на антиоксидантната активност и нитрат-редуктазата със смес от наночастици от SiO₂ и TiO₂ в *G. max*, в допълнение към по-добрия продуктивен

НАНОТОРОВЕ

ефект и увеличаване на капацитета за поемане на вода и тор на моделното растение. Установено е, че прилагането на наночастици от TiO_2 насърчава фотосинтезата както при видима, така и при ултравиолетова светлина и при растежа на спанак. Наблюдавано е увеличение с 73% на сухото тегло, трикратно по-висока скорост на фотосинтезата и 45% увеличение на хлорофила след третиране на семена от спанак. Авторите предполагат, че увеличаването на скоростта на фотосинтезата може да се дължи на увеличаването на абсорбцията на неорганични хранителни вещества, което увеличава използването на органични вещества и подтискането на свободните кислородни радикали.

За разлика от повечето наночастици, чието приложение при висока концентрация не се препоръчва, поради наблюдаваното отрицателно въздействие, наночастиците от TiO_2 , приложени в концентрации, достигащи до 2000 ppm, повишават кълняемостта на семената и жизнеността на разсад от *Brassica napus*. Следователно, различните метални наночастици очевидно показват положително влияние при различни концентрационни диапазони, напр. Pd и Au при по-ниска концентрация, Si и Cu при по-висока концентрация, а Au и Cu в комбинирана смес. Този поведенчески модел се потвърждава в полеви проучвания с *G. max* и *Brassica juncea*: нанокристален прах от желязо, кобалт и мед при изключително ниска концентрация, повишава степента на кълняемост на семената, както и подчертано увеличава индекса на хлорофила, броя на възлите и добива от реколтата. Подобно, листното пръскане на злато върху растенията при полеви експерименти показва положителни ефекти, водещи до повишена височина на растенията, диаметър на стъблото, брой клонове, брой на шушулките и добив на семена и, интересно, подобрява редукирания статус на третиранията растения.

Етични въпроси, свързани с безопасността на наноторовете

Несъмнено нанотехнологиите имат невероятен потенциал да революционизират много аспекти на човешкия живот. Въпреки това напредъкът на този мултидисциплинарен клон от науката, особено ползите от практическото приложение на наночастиците, трябва да бъдат обвързани с някои предпазни мерки.

Основната грижа в световен мащаб е дали неизвестните рискове от наночастиците, които включват тяхното въздействие върху околната среда и здравето, надделяват над потенциалните им ползи. По този начин рисковете, свързани с прилагането на наночастици, все още предстои да бъдат оценени преди прилагането на наночастици да бъде напълно прието и изпълнено. Във връзка с това е разработена "нанотоксикология", която отговаря за оценката на токсикологичния потенциал и насърчаването на безопасния дизайн и използване на наночастици. Поради задълбочения количествен анализ на потенциалното въздействие върху здравето, екологичният клирънс и безопасното обезвреждане на наночастиците може да се очаква подобрене в дизайна на по-нататъшни приложения на нанотехнологиите.

НАНОТОРОВЕ

До сега няма човешка болест, пряко свързана с употребата на наночастици. Наночастиците, които съставляват част от материята на ултрадребните частици, могат да влизат в тялото на хора / животни по орален, респираторен или интрадермален път. В момента има общоприето предположение, че малкият размер на наночастиците им позволява лесно да влизат в тъканите, клетките и органелите и да взаимодействат с функционалните биомолекулни структури (т.е. ДНК, рибозоми), тъй като реалният физически размер на конструираните наноструктури е подобен на много биологични молекули (напр. антитела и протеини) и структури (например вируси).

Разбира се, все още има необходимост от правилно физикохимично характеризирани и определяне на подходящи протоколи за експозиция и надеждни методи за оценка на резултата от наночастиците в околната среда, тяхната интернализация и тяхната кинетика в живите организми. Това са предпоставките за създаване на оптимални експериментални условия, които ще позволят точно определяне дали дадена наночастица представлява заплаха за човешкото здраве. Интердисциплинарните изследвания на учените в областта на материалите и природозащитата обаче, допринасят за идентифицирането на истинските опасности от нанотехнологиите, ако има такива. Хетерогенният и развиващ се характер на нанотехнологиите прави оценката на риска доста субективна. Липсата на стандартизирани методологии и насоки затруднява сравняването на оценките за безопасност / токсичност от различни изследователски групи. Най-вероятно е различните видове наночастици да се различават по отношение на токсикологичните им свойства. За да се тълкуват правилно всички токсикологични данни, е важно да се изчислят и определят очакваните концентрации на наночастици, на които могат да бъдат изложени биологичните системи или които са налични в екосистемите. Оценката на риска от наночастици трябва да се извършва за всеки отделен случай. По този начин етичните въпроси трябва да са специфични за конкретен продукт в даден момент и са необходими алтернативни оценки, за да се вземат предвид етичните, социалните и политическите ценности, които се отнасят до политики, включващи в себе си и нанотехнологиите.

Използването на нанотехнологиите в селското стопанство е много важно, тъй като пряко засяга хората. Наноторовете позволяват наночастиците да навлязат в хранителната верига, което осигурява тяхното разпространение във всеки организъм, свързан с хранителната верига. Буквално всички вещества могат да бъдат токсични за растенията, животните или хората при известна степен на експозиция. Това обаче, не ограничава тяхното използване в различни приложения, които са формулирани с оглед на критичната експозиционна концентрация. Както бе споменато по-горе, насърчаващият ефект на наночастиците върху растежа и физиологията на растенията се изяснява при много ниски концентрации. Следователно, трудно е да се повярва, че тези концентрации ще представляват значителни щети за здравето и околната среда.

Много страни са идентифицирали потенциала на нанотехнологиите в секторите на храните и селското стопанство. Междувременно, те признават необходимостта от оценка на въздействието на нанотехнологиите върху безопасността на храните. Както е

НАНОТОРОВЕ

предложено от научния комитет на Европейския орган за безопасност на храните (ЕОБХ), парадигмата за оценка на риска (идентификация на опасностите, характеризирани на опасностите, оценка на експозицията и характеризирани на риска) е приложима за наночастиците (Научен комитет на ЕОБХ 2011). Оценката на риска от тези наночастици в храните и фуражите обаче, трябва да отчита специфичните свойства на наночастиците в допълнение към тези, които са общи за еквивалентните ненаноформи.

Решаването на риска, свързан с употребата на определени наночастици в храните и фуражите, означава отчитане на различни параметри, сред които физикохимичното характеризирани на наночастиците, тяхната стабилност в храните и фуражите, токсикокинетиката (абсорбция, разпределение, метаболизъм / биотрансформация, екскреция / елиминирани) в човешките и животинските системи.

ГЕННО ИНЖЕНЕРНИ МИКРООРГАНИЗМИ КАТО БИОТОРОВЕ

Генетично модифицирани бактерии за селскостопански цели

Има многобройни бактериални родове, чиито представители могат да повлияят на растежа на растенията и тяхната продукция. Сред тези представители съществуват патогени, които могат да потиснат растителните заболявания и се използват като биоконтролни щамове. Друга група бактериални видове могат да допринесат за подобрен растеж на растенията чрез повишаване на достъпа до хранителни вещества. Тези бактерии съставляват биоторовете и са известни също така като ризобактерии, стимулиращи растежа (РСРР). Терминът РСРР е свързан със способността на тези бактерии да растат добре на повърхността между почвата и корена на растението (ризосферата). РСРР може да се прилагат като покритие на семената или директно върху почвата. Въпреки това, за да упражнят своя стимулиращ растежа ефект, достатъчен брой от въведените РСРР трябва да оцелеят в почвата и ризосферата, което не винаги се случва. Следователно, ефикасността на РСРР не винаги е достатъчна за търговски приложения и е необходимо да се подобри тяхното представяне. Един от възможните подходи е да се прилагат генетични модификации, за да се улесни ефективността на оцеляване.

Оцеляване на генетично модифицирани бактерии в почвата

Всяка микробна клетка, въведена в околната среда, ще срещне голям брой биотични и абиотични фактори, които влияят върху нейното оцеляване. Биотичните и абиотичните фактори са еднакво важни. По този начин, високото съдържание на глина, високото рН и относително високото съдържание на влага могат да имат положителен ефект върху бактериалната преживяемост. Обратно, сухите периоди, наличието на конкурентни

НАНОТОРОВЕ

микроорганизми, хищничеството от протозои и лизирането от бактериофаги влияят отрицателно върху броя на въведените бактерии. Говорейки за биотичните фактори, влияещи върху активността и оцеляването на въведените бактерии, наличието на корени на растенията, които осигуряват хранителни вещества за микроорганизмите, живеещи около тях, е много важно. Сред микроорганизмите, които са добре приспособени към ризосферата, има членове на родовете *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* и *Xanthomonas*.

Микробното оцеляване зависи от взаимовръзката между условията на околната среда и физиологичното състояние на бактериите. В резултат на тези взаимодействия бактериалните клетки могат да превключват своя метаболизъм в различни физиологични състояния. Например, клетките могат да станат по-устойчиви на стрес или да формират клетъчни джуджета, те могат да произвеждат екзополisahариди за защита, те могат да влязат в жизнеспособно, но некултивируемо състояние, а някои могат да образуват спори или асоциации с растения.

Може да се предположи, че моделът на оцеляване на генетично модифицираните бактерии ще последва един от техните родители от див тип. Всъщност, тази екстраполация трябва да се прилага с някои предпазни мерки. Първо, експресията на вмъкнатите гени изисква допълнително количество енергия, което би могло да намали тяхната екологична годност. В допълнение, вмъкването би могло да наруши неизвестни функции, отслабващи конкурентоспособността на щамовете. На второ място, възможно е ГММ да се развият и адаптират към преобладаващите условия на околната среда чрез естествен подбор. Това последно твърдение се подкрепя от доказателства за еволюционна адаптация на бактериите за разграждане на хербицида 2,4-дихлорофеноксioцетна киселина, което води до повишена конкурентоспособност при използване на сукцинат като субстрат. По същия начин се съобщава, че различни видове стрес в околната среда биха могли да облекчат инвалидните ефекти на мутациите: организмите могат да станат по-толерантни към генетичните смущения при определени видове стрес в околната среда.

Установено е, че ГММ преживяват по-добре от щамовете от див тип в проучвания при изкуствени условия на растеж. Повишеното оцеляване на ГММ рядко се наблюдава при полеви условия. Често популацията от въведени бактериални клетки намалява бързо в почвата и видовете ГММ оцеляват по начин, подобен на този на немодифицираните бактерии. Има много експериментални изследвания, при които не може да бъде открита разлика в оцеляването между ГММ и родителския щам (за *Pseudomonas chlororaphis*, *P. fluorescens* и *Sinorhizobium meliloti*). Освен това се съобщава, че някои ГММ са генетично изчерпани в сравнение с родителските щамове. Предполага се, че наличието на редица конститутивно експресирани маркерни гени в ГММ има отрицателен ефект върху оцеляването им в конкуренция с щам див тип. Най-вероятно това е метаболитният товар, който е отговорен за намалената годност, тъй като този ефект не се среща при богати на хранителни вещества условия.

За правилното тълкуване на данните за оцеляването на бактериите от решаващо значение е да се използва надежден метод за откриване, тъй като клетките, които навлизат

НАНОТОРОВЕ

в състояние, което не може да се култивира, не могат да бъдат открити със стандартни техники за култивиране. Освен това, различни проучвания показват, че внесените в почвата ГММ стават некултивируеми. Наличието на жизнеспособни, но некултивируеми клетки, мъртви клетки или “гола” ДНК, открити чрез молекулярни техники, допринася за сложността и екологичната значимост на ГММ и тяхната пригодност в контекста на ефекта от въведената генетична модификация. Надеждният начин, по който ефектът от малките разлики във годността ще бъде измерен, е съвместното инокулиране на ГММ и неговия родителски щам, който ги поставя в пряка конкуренция. Резултатите от такива експерименти с директна конкуренция обаче трябва да се интерпретират внимателно, тъй като търговското приложение на ГММ не включва пряка конкуренция между ГММ и техните щамове от див тип.

Всички тези данни - до известна степен противоречиви - показват, че заключението относно оцеляването на ГММ в сравнение с техните родителски щамове не може да бъде определено с точност. Във всеки случай, когато способността за колонизиране и оцеляването на ГММ са от значение, тези параметри трябва да бъдат определени.

Влияние върху околната среда на ГММ, инокулирани в почвата

Възможните ефекти от освобождаването на ГММ в естествените микробни екосистеми са доста различни. Обхватът покрива събития като въвеждане на органичен субстрат, изместване на видовете, промени в структурата на популацията и възможна загуба на определени функции; производство на токсични метаболити, което може да доведе до нарушаване на ключови екологични процеси. Трябва да се има предвид, че малките промени в състава на съобществото са трудни или дори невъзможни за определяне, а връзката между микробното разнообразие и функционирането на екосистемите не е съвсем ясна. Несъмнено почвеното микробно разнообразие е огромно, с голямо разнообразие на функции. Изчезването на няколко вида с определени функции ще бъде трудно да се открие, тъй като много функции могат да се извършват от голям брой различни микроби. По този начин само екстремни смущения могат да засегнат почвените микробни съобщества до степенята, в която определени функции ще бъдат негативно повлияни.

Ограничената културизация на местната микрофлора в почвата е един от основните проблеми в микробната екология. Техниките, базирани на ДНК и РНК, които не включват култивиране на микроорганизми, понастоящем се използват за откриване на въздействието на ГММ върху местните микробни съобщества. Методите, които са подходящи за анализиране на измененията в структурите на съобществата, включват денатурираща градиентна гел електрофореза (DGGE), случаен рибозомален рестрикционен анализ (ARDRA), полиморфизъм в дължината на терминални рестрикционни фрагменти (T-RFLP) и полиморфизъм на конформация с единична верига (SSCP).

НАНОТОРОВЕ

Съдба и въздействие на щамовете биофертилизатори - поведение в полеви условия

Генетично модифицираните бактерии допринасят за повишената наличност на хранителни вещества за растенията и по този начин увеличават растежа на растенията.

Най-важните биоторове включват бактерии, като *Azospirillum* и *Rhizobium*, които могат да фиксират азот. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium* са растителни симбионти, които образуват коренни грудки (нодули) в бобови растения и фиксират атмосферния азот. Тези бактерии са широко използвани като растителни инокуланти за увеличаване на добива от бобови култури. Съществува дълга история на безопасна употреба на немодифицирани ризобии като инокулант за увеличаване на добивите. Повишаването на добива обаче, е променливо и успехът на инокулантите изглежда зависи от конкуренцията с местни щамове, които обикновено са по-малко ефективни. Известно е, че *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium* преживяват в почвата години, в някои случаи дори и без присъствието на специфичния си гостоприемник. Установено е, че *Rhizobium* е способен да образува нодули, дори когато гостоприемникът се засажда отново след няколко години. Това показва, че присъствието на растението гостоприемник не е абсолютно необходимо за оцеляването им, но също така и характеристиките на щама, който не е свързан със симбиозата, играят роля в оцеляването му в земята в продължение на години. Бързо растящите видове *Rhizobium* са по-податливи на изсушаване от по-бавно нарастващия *Bradyrhizobium*.

Генетично модифицирани щамове *Azospirillum* и *Rhizobium*

С изключение на въглеродния диоксид (CO_2), който растенията получават от атмосферата, те получават всичките си хранителни вещества от почвата. Природата е разработила различни механизми за доставка на хранителни вещества на растенията чрез възобновяеми ресурси, а най-добрият пример за това е биологичното азотно фиксиране при бобови растения. Азот-фиксиращите бактерии могат да се разглеждат като саморазпространен източник на азот за растенията. За съжаление, не всички растения са в състояние да осъществят такова взаимодействие с N_2 -фиксиращи бактерии. Ето защо в момента добивите на растителна продукция все още до голяма степен зависят от влагането на химически торове. Повечето от тези торове са много подвижни в почвата и се доставят в по-големи количества, отколкото се изисква за оптимален растеж на растенията. Загубата на ценни съединения е не само от икономическо значение; това също създава сериозни проблеми за околната среда чрез изтичане на повърхностни и подземни води и натрупване в атмосферата.

Разработени са различни стратегии, насочени към по-добро усвояване на торовете от корените на растенията. Те включват други формулировки на торове (напр. бавно освобождаващ се тор) и използването на ризобактерии, стимулиращи растежа на растенията (PCPP).

НАНОТОРОВОЕ

PCPP могат да упражняват своя ефект както пряко, така и непряко. Непряката схема включва упражняване на биоконтрол на патогени и вредни микроорганизми. Най-добре документираният пример за PCPP, който действа в пряка насоченост на растежа, е фитостимулацията. Различни бактериални родове са способни да произвеждат фактори, стимулиращи растежа на растенията (ауксини, цитокинини и т.н.) и когато колонизират корените на растенията, те стимулират растежа на корена. Това осигурява по-добро поемане на вода и хранителни вещества от растенията и може да доведе до по-високи добиви.

ГМ *Azospirillum* увеличава приема на азот

Известно е, че щамове *Azospirillum* могат да стимулират развитието на корените на растенията и да увеличат поемането на азот чрез произведените от тях фитохормони. Въпреки това механизмите и условията, при които тези бактерии произвеждат фитохормони, както и взаимодействието между бактериите и корените на растенията, все още не са дефинирани и изискват по-добро разбиране.

За да се изяснят тези механизми, трябва да се обърне внимание на няколко важни въпроса / подхода:

- генетичните и биохимични основания за синтеза на индол-3-оцетна киселина (IAA), хормонът, който стимулира растежа на растенията, произведен от *Azospirillum*;
- Изграждането на генетично модифицирани петна от *Azospirillum* с известни производствени нива на IAA (т.е. IAA-минус, IAA-атенюирани, IAA-свърхпроизводители);
- Тестване на въздействието на тези генетично модифицирани бактерии върху растенията (насърчаване на растежа, поглъщане на азот) и върху околната среда (взаимодействие с жива микробна флора, оцеляване и разпространение) при полеви условия.

В момента съществуват щамове на ГМ *Azospirillum* с тези основни характеристики. Изследванията с тези щамове са фокусирани върху тяхното въздействие върху резидентните микробни популации, растежа на растенията и нивата на поглъщане на азота от почвата. Тези проучвания се провеждат в лабораторни експерименти (т.е. фитостатни камери и оранжерии), за да се получи жизненоважна информация за начина, по който ГМ щамове могат да се държат при полеви условия. Експериментите се провеждат с редица култури, видове почви и климатични условия, които представляват съществуващите селскостопански параметри в Европа. Независимо от напредъка на тези изследвания, е необходимо задълбочено и внимателно изследване при задържане, преди ГМ *Azospirillum* да бъде разгледан за освобождаване на полето.

ГМ *Rhizobium* щамове с повишена конкурентоспособност

Инокулирането на растения с високоефективни азот-фиксиращи бактерии е широко използван подход за повишаване на производителността на бобовите култури. Това инокулиране не винаги е успешно, тъй като естествените почвени бактерии с ниска ефективност за фиксиране на азота могат да излязат извън конкуренцията на въведените

НАНОТОРОВЕ

щамове по отношение на иницирането на грудки. Това, което е от решаващо значение за успешното използване на такива инокуланти, е тяхната конкурентоспособност, т.е. способността да образуват грудки. Така, инокулиращите щамове се модифицират по такъв начин, че да заемат достатъчно количество коренни възли, за да осигурят високи нива на фиксиране на азота за растението гостоприемник.

Експерименти с щамове *Sinorhizobium meliloti* от различен географски произход по отношение на тяхната конкурентоспособност за корени от люцерна показват, че във всички случаи това свойство се засилва чрез генетична манипулация. Споменатата генетична манипулация включва модифициране на експресията на *nifA* гена, който е отговорен за контрола на всички останали азот-фиксиращи (*nif*) гени. Когато щамове на ГМ *S. meliloti* се смесят с дивите, първите заемат по-голямата част от грудките на корените от люцерна. Точният механизъм на подобрието все още не е разбран, но се предполага, че *nifA* регулира експресията на гените, различни от *nif* клъстера, което води до предимство по време на образуването и развитието на нодули.

Друга особеност, която допринася за конкурентоспособността на *Rhizobium* при образуването на грудки е способността им ефективно да разпознават корените на растенията. Това е много важно, тъй като ефективната инокулация означава по-ниски дози от бактериалния щам. Освен това движението на инокулационния щам към корените на растенията е друг фактор, който оказва влияние върху конкурентоспособността. Експериментите с щамове ГМ *Rhizobium leguminosarum*, конструирани да експресират репортерния ген на бета-глюкуронидаза (*gusA*), показват, че процентът на нодули, индуцирани от ГМ *gusA*-белязан щам, е по-висок в сравнение с нодулите, индуцирани от неподвижен щам с дефицит на флагелуми. По този начин се доказва, че функционалните фрагменти са необходими за ефективна конкуренция за нодули.

Всички тези данни предоставят ценна информация за механизма на коренното привличане, позволяващ развитието на щамове *Rhizobium* с повишена конкурентоспособност за образуване на грудки и повишена специфичност на гостоприемника.

Въздействие на щамовете ГМ *Rhizobium* върху асфузионни микоризни гъби

Асфузионните микоризни гъби са важна група гъби, които формират симбиотични взаимоотношения с растенията. Основен въпрос е дали приложението на щамовете ГМ *Rhizobium* с повишена конкурентоспособност води до увеличаване на колонизацията и възстановяването на корените на растенията или пречи на полезните симбиотични взаимоотношения.

При лабораторни и полеви експерименти е доказано, че щамът ГМ *Sinorhizobium meliloti* с подобрена способност за образуване на грудки, не възпрепятства образуването на микориза от гъбния вид *Glomus mosseae*. Напротив, ГМ *S. meliloti* увеличава способността за придобиване на хранителни вещества на микоризното растение.

НАНОТОРОВЕ

ГМ *Rhizobium*: освобождаване на полето

Няколко вида *Rhizobium* се модифицират генетично за подобряване на фиксирането на азота или за изследване на тяхното оцеляване, като се използват маркери чрез провеждане на полеви опити.

Така, щам на *R. leguminosarum*, маркиран с Tn5, въведен в полето като инокулант за грах и зърнени култури, се запазва в продължение на 5 години в парцелите, където се отглежда грах. Устойчивостта на щамата се дължи на типа почва, отглеждането на подходящите растения гостоприемници и климатичните условия. Потенциалните нецелови ефекти върху микробната екосистема не са проучени.

Използването на подобрен щам на *R. meliloti* с допълнителни копия на *nifA* и *dctABC* води до 12.9% увеличение на добива на люцерна в полево проучване. Въпреки това, в места с високи концентрации на азот или природни ризобииални популации, добивът на люцерна не се увеличава.

Изучава се съдбата на щам *R. meliloti*, маркиран с Tn903 в участъци, засадени с люцерна и се установява, че броят на клетките бързо намалява след инокулирането. Една година след въвеждането, броят на въведените клетки спада под броя на местните ризобии.

В полеви експеримент, в ризосферата на люцернови растения се освобождава щам на ГМ *S. meliloti* с повишена конкурентоспособност за запълване на грудките. Ефектите на ГМ и дивия тип върху местните микробни общности са изследвани чрез полиморфизъм с дължина на рестрикционния фрагмент (RFLP) и температурен градиентен гел електрофореза (TGGE). Инокулацията на див тип и ГММ има само ограничени ефекти. Изглежда, че растенията от люцерна имат по-голямо влияние върху микробната общност, отколкото инокулираните щамове.

Проучени са екосистемните ефекти на *Luc*-маркиран *S. meliloti* в полеви експеримент с *Medicago sativa*. Бактериите са открити до 12 седмици след въвеждането. Не могат да бъдат открити ефекти от щамовете върху концентрациите на въглерод и азот в почвата и няма разлики в общия брой колонии-образуващи единици на местни микроорганизми. Над хиляда бактериални изолати, получени от участъците, са допълнително проучени чрез ARDRA и доминантните групи са идентифицирани чрез 16S rRNA секвениране. В ризосферата на *M. sativa* броят на *Alcaligenes* и *Pseudomonas* е намален в резултат на инокулацията. Молекулярният анализ чрез изследване на профилите на SSCP разкрива промени, потвърждаващи ефекта на инокулацията върху резидентната микробна популация.

В Китай изолати от див тип и ГМ *Alcaligenes faecalis* са въведени в оризовите полета в голям мащаб, за да се подобри производителността на реколтата. *A. faecalis*, азот-фиксиращ изолат, който не образува грудки, е генетично модифициран чрез въвеждане на конститутивно експресиран *nifA* регулаторен ген. Азотната фиксация изглежда е с 15-20% по-висока и добивът е 5-12% по-висок в сравнение с нетретираните растения. Възможните екосистемни ефекти от въвеждането на този ГМ щам са изследвани чрез DGGE на амплифицирана 16S рДНК. Въведеният ГМ щам оцелява добре в ризосферата. DGGE профилите на пробите, третирани с модифицирания щам, наподобяват профилите на

НАНОТОРОВОЕ

нетретираните проби през 40-те дни от експеримента, което предполага, че няма очевидни ефекти върху бактериалното съобщество. Като цяло, оцеляването на щама и увеличаването на добива на култури показва, че това производно на *A. faecalis* е добър кандидат за търговско приложение, тъй като неговите екосистемни ефекти изглеждат много ограничени.

Стресът и съдбата при полеви условия на щамовете ГМ *Rhizobium* са изследвани при теренни проучвания с моделна система, съдържаща различни щамове ГМ *Rhizobium leguminosarum* v. *Viciae*, маркирани с ген на *lacZ* и HgCb резистентни (*mer* гени), инокулирани в ризосферата на растения грах. Използвани са три модифицирани щама:

- щам 1110, съдържащ плазмид pDG3, носещ гени за резистентност към HgCb (*mer* гени) и *lacZ*, чиято експресия е под контрола на *lacZ-lacO* системата;
- щам 1111, носещ плазмида pDG4, в който *lacZ* генът е конститутивно експресиран при високи нива;
- 1112 щам, съдържащ копие от *mer* гени и регулиран *lacZ* ген, вмъкнат в хромозомата.

Дивият тип *R. leguminosarum* v. *Viciae* 1003 се използва като контрола.

Тези щамове се наблюдават съгласно репортерната система *lacZ* / *mer* заедно с метаболитната активност на почвата плюс капацитета за азот-трансформация.

Теренните експерименти показват, че всички тествани щамове колонизират ризосферата в еднаква степен; подобни стойности са определени за степента на дишане и метаболитната активност на почвата, както и за азот-трансформацията капацитет на всички тествани щамове. Тези резултати показват, че макар присъствието на растението да има значително въздействие върху минерализацията на въглерода в почвата, въздействието на щамовете ГМ *Rhizobium* не може да бъде различавано от въздействието на щама от див тип, а също така предполагат, че въздействието на растението върху микробната активност е значително по-голямо от въздействието на ГМ инокуланти в сравнение с щамове от див тип.

Независимо от факта, че полевите изпитания с ГМО биоторове са ограничени, първоначалните резултати за тяхното използване са обещаващи по отношение на подобреното представяне в селскостопански приложения. ГМ биоторове са въведени с окуражителен успех по отношение на оцеляването и активността на инокуланти, което зависи от условията на околната среда. Досега нецелевият ефект на докладваните генетично модифицирани биощамове е малък и незначителен в сравнение с естествените вариации, като например разликите между популациите от различни растителни видове.

Нашите познания обаче, за ползите, съдбата и последиците от генетично модифицираните щамове в околната среда все още са твърде ограничени и частични.

Въпросите, които трябва да бъдат решени, включват: как и кога (в кое физиологично състояние) бактериите оцеляват най-добре в почвата; какъв е ефектът им върху

естествената микрофлора; как едно смесено микробно съобщество може да бъде структурирано и оптимизирано за използване в селското стопанство. И не на последно място, какви са ефектите за екосистемата от генетично модифицираните щамове, особено върху нецелевите организми.

ЛИТЕРАТУРА

1. A.-B. Bjerre. European Biofertilizer Policy and Potential Market. **Presented at:** Biomass Asia Conference, 2013, 20–22 May.
2. S. Syed, University of Pune, Ph. D. Thesis. Chapter 1, Biosynthesis of metals (such as gold, silver and platinum) and quantum dot (CdTe) nanoparticles. pp 1-45.
3. S. Sekhon. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2014, 7: 31–53.
4. M. Monreal, M. De Rosa, S. C. Mallubhotla, P. S. Bindraban, and C. Dimkpa. Nanotechnologies for increasing the crop use efficiency of fertilizer-micronutrients. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52, 3: 423–437.
5. J. C. White. Nanotechnology use in agriculture: benefits and potential risks. Presented at: 2013 APHL Annual Meeting and 7th Government Environmental Laboratory Conference Raleigh, NC.
6. N. R. Scott. What lies in the future for nanoscale science and engineering in agriculture, food and natural resources? Presented at: 2014 USDA Agricultural Outlook Forum, Arlington, VA.
7. M. Viebahn. Effect of genetically modified bacteria on ecosystems and their potential benefits for bioremediation and biocontrol of plant diseases – a review. In: *Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms*. E. Lichtfouse (ed.). *Sustainable Agriculture Reviews*, 2, 45-70.
8. N. Veronica, T. Guru, R. Thatikunta, and S. Narender Reddy. Role of nano fertilizers in agricultural farming. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2015, 1 (1), 1-3.
9. P. du Jardin. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 2015, 196, 3-14.
10. P. Khandel and S. Kumar Shahi. Microbes mediated synthesis of metal nanoparticles: current status and future prospects. *Int. J. Nanomaterials and Biostructures*. 2016; 6(1), 1-24.

11. P. Solanki, A. Bhargava, H.j Chhipa, N. Jain, and J. Panwar. Nano-fertilizers and their smart delivery system. In: Nanotechnologies in Food and Agriculture, M. Rai, C. Ribeiro, L. Mattoso, and N. Duran Editors 2015, 81-101. Springer International Publishing Switzerland.
12. R. Prasad, V. Kumar, and K. S. Prasad. Nanotechnology in sustainable agriculture: Present concerns and future aspects. African Journal of Biotechnology, 2014, 13(6), 705-713.
13. U. Walsh, F. O'Gara, I. Economidis, and S Hogan. Harnessing the potential of genetically modified microorganisms and plants European Commission publications in the areas of research and innovation, 1999, 1-52.