

Biodegradability of Diazinon Poison in Grand Soils by Bacterias Isolated from them

Mona Mansouri

PhD student of Environmental Pollution, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Aptin Rahnavard

* Assistant Professor, Department of Environmental, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

rahnavard_aptin@yahoo.com

Masood Ghane

Associate Professor, Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Received: 2022/11/01

Accepted: 2023/02/20

Document Type: Research article

ABSTRACT

Background and purpose: Diazinon is an organophosphorus insecticide that is widely used in paddy fields and gardens. The entry of resistant pollutants into drinking water sources, soil, and agricultural products can be harmful to human health and the environment. This study aimed to identify and isolate diazinon-degrading bacteria and measure the amount of poison decomposed by superior bacteria in liquid and soil environments.

Materials and Methods: Sampling was conducted from Tonekabon gardens. The strains were identified and sequenced using polymerase chain reaction based on 16S rRNA. The rate of diazinon degradation by the isolated bacteria was measured by gas chromatography.

Results: Two strains of diazinon-degrading bacteria, *Serratia* and *Enterobacter cloacae*, were identified. Bacteria with diazinon concentrations of 10 and 20 ppm were cultured in broth and soil for 10 days, and the amount of poison decomposition was measured. The results indicated that *Serratia* bacteria in the broth medium, with initial concentrations of 10 and 20 ppm, consumed 64.3% and 78.4% of diazinon, respectively, while in the soil with the same concentration, it decomposed 90.2% and 98.25% of diazinon. *Enterobacter cloacae* bacteria consumed and decomposed diazinon in the broth and soil environments, with percentages of 23.1, 17.95, 31.19, and 88.05%, respectively. According to the results, *Serratia* has a higher decomposition ability compared to *Enterobacter*.

Conclusion: The results of this research showed that some microorganisms in the soil have the ability to decompose diazinon. Utilizing these microorganisms and other biological methods to clean contaminated soils can be a suitable approach.

Keywords: Bacteria, Soil, Diazinon, Biodegradability, *Serratia*

Citation: Mansouri M, Rahnavard A, Ghane M. Biodegradability of Diazinon Poison in Grand Soils by Bacterias Isolated from them. *Journal of Research in Environmental Health*. 2023; 9(1):66-76.

زیست تخریب پذیری سم دیازینون موجود در خاک‌های باغی توسط باکتری‌های جدا شده از آنها

چکیده

زمینه و هدف: دیازینون، یک حشره‌کش ارگانوفسفره است که به‌طور گسترده در شالیزارها و باغات استفاده می‌شود. ورود آلاینده مقاوم به منابع تأمین آب شرب، خاک و محصولات کشاورزی، می‌تواند اثرات مخربی بر سلامت انسان و محیط زیست داشته باشد. مطالعه حاضر با هدف شناسایی و جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سم دیازینون و سنجش مقدار سمی که باکتری‌های برتر در محیط مایع و خاک تجزیه می‌کنند، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش نمونه برداری از باغات تنکابن انجام شد. شناسایی و تعیین توالی سویه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز بر اساس $16S\ rRNA$ صورت گرفت. میزان تجزیه دیازینون توسط باکتری‌های جدا شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی سنجش شد.

یافته‌ها: دو سویه باکتری تجزیه کننده دیازینون از جنس سراشیا و انتروباکترکلوآکا شناسایی شدند. باکتری‌ها با غلظت ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام دیازینون در محیط براث و خاک به مدت ۱۰ روز کشت داده شدند و مقدار تجزیه سم مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بر اساس نتایج، باکتری سراشیا در محیط براث با غلظت اولیه ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام، $3/64\%$ و $4/78\%$ مصرف دیازینون داشت و در محیط خاک با همین غلظت $2/90\%$ و $25/98\%$ سم دیازینون را تجزیه کرد. باکتری انتروباکترکلوآکا در محیط براث و خاک به ترتیب $1/23\%$ ، $95/17\%$ و $19/31\%$ ، $5/88\%$ دیازینون را مصرف و تجزیه کرد. با توجه به نتایج حاصل، باکتری سراشیا بیشترین قابلیت تجزیه را نسبت به انتروباکتر دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد برخی میکروارگانیسم‌های موجود در خاک، توانایی تجزیه دیازینون را دارند. استفاده از این میکروارگانیسم‌ها و دیگر روش‌های زیستی جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده می‌تواند روش مناسبی باشد.

کلیدواژه‌ها: باکتری، خاک، دیازینون، زیست تخریب‌پذیری، سراشیا

◀ **استناد:** منصورى م، راه‌نورد الف، قانع م. زیست تخریب‌پذیری سم دیازینون موجود در خاک‌های باغی توسط باکتری‌های جدا شده از آنها. *فصلنامه پژوهش در بهداشت محیط*. بهار ۱۴۰۲؛ ۹ (۱): (۶۶-۷۶).

منا منصورى

دانشجوی دکتری آلودگی محیط‌زیست، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

آپتین راه‌نورد

* استادیار، گروه محیط زیست، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران. (نویسنده مسئول):

rahnavard_aptin@yahoo.com

مسعود قانع

دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱

نوع مقاله: پژوهشی

مقدمه

آفت‌کش‌ها یکی از آلاینده‌هایی هستند که به‌علت رشد روزافزون جمعیت و افزایش نیاز به تولیدات کشاورزی و مواد غذایی، استفاده از آن‌ها در بخش کشاورزی در حال افزایش است و در طی دهه‌های گذشته، جزء ضروری دنیای کشاورزی بوده‌اند (۱). سموم مورد استفاده در کشاورزی می‌توانند از طریق آبیاری، بارندگی و انتقال از طریق نهرهای انحرافی، وارد منابع آب سطحی شده و سبب آلودگی این آب‌ها شوند که این مسئله می‌تواند اثرات ناخوشایندی را هم به‌طور غیرمستقیم از طریق اثر بر روی محصولات کشاورزی و ورود به زنجیره غذایی و هم به‌طور مستقیم از طریق اثر بر سلامتی افرادی که در نزدیکی این منابع زندگی و از این منابع استفاده می‌کنند، ایجاد کند (۲). آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (OPs)^۱ در اواسط سال ۱۹۶۰ برای جایگزینی ارگانو کلره و کنترل آفات با این فرض که سمیت بالا و ماندگاری کمتری دارند، معرفی شدند (۳، ۴). استفاده بیش از حد از آفت‌کش‌ها منجر به ماندگاری بقایای آن‌ها در محیط برای یک دوره نامشخص می‌شود که می‌تواند تهدیدهای مهمی برای اکوسیستم آبی و خشکی ایجاد کند (۵). دیازینون، یک حشره-کش ارگانوفسفره است که به‌طور گسترده در شالیزارها و باغات ایران استفاده می‌شود. به‌دلیل حلالیت کم در آب، نفوذ دیازینون به آب‌های زیرزمینی بسیار کم است، اما به‌طور نسبی پتانسیل اتصال بالایی به خاک دارد. علاوه بر این، بسته به هوادهی در خاک، هفته‌ها تا ماه‌ها حتی در آب باقی می‌ماند (۶). این سم با توجه به pH، دما، نور خورشید و میکروارگانیسم‌ها، نیمه‌عمر ۷ ساعت تا ۱۲ هفته‌ای در آب دارد (۷) و همچنین ۲۱-۱۰۳ روز در خاک باقی می‌ماند (۸). از متداول‌ترین روش‌های استفاده شده برای حذف آن جذب حرارتی، شستشوی خاک‌های آلوده، حذف زیستی، تصفیه در زمین، فرآیندهای شیمیایی و فرآیندهای اکسیداسیون مستقیم است (۹). در این راستا یکی از روش‌های درمانی امیدوارکننده برای از بین بردن آلاینده‌ها از مکان‌های آلوده، بهره‌برداری از توانایی میکروارگانیسم‌ها است. در این فرآیند، میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یک استراتژی درمانی جایگزین به‌دلیل اثربخشی، خطر کم، ارزش اقتصادی و ایمنی محیط‌زیست به‌عنوان پالایش زیستی شناخته می‌شود.

زیست‌پالایی از میکروارگانیسم‌های خاصی برای تجزیه مواد شیمیایی مصنوعی خطرناک در محیط استفاده می‌کند (۱۰). در کشور ما با توجه به وسعت استفاده از سموم ارگانوفسفره در سالیان دراز، نیاز به روش‌های پاک‌سازی کارآمد، اقتصادی و سازگار با محیط‌زیست برای رفع آلودگی خاک‌های آغشته به این ترکیب‌ها احساس می‌شود. پروژه‌های میدانی پاک‌سازی زیستی خاک در کشور ما خیلی کم به اجرا درآمده است. از مهم‌ترین عوامل، ناشناخته بودن میکروارگانیسم‌های بومی در تجزیه ترکیب‌های ارگانوفسفره می‌باشد. تحقیقاتی در جهان برای حذف بیولوژیکی آفت‌کش‌ها انجام شده است (۱۱). فتی و همکاران در مطالعه‌ای باکتری‌هایی از خانواده باسیلوس در خاک مزارع آلوده به سم جداسازی کردند که قادر به تجزیه سم آلی کلروپیریفوس بودند (۱۲). نتایج مطالعه نصرالهی و همکاران که در مورد تأثیر باکتری‌های اندوفیت برنج بر تخریب دیازینون انجام شد، نشان داد اندوفیت‌های جدا شده، توانایی تجزیه دیازینون را داشته و از آن به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. در تعیین توالی مشخص شد جدایه‌ها مربوط به جنس باسیلوس است (۱۳). بریسنو و همکاران توانایی تجزیه زیستی سویه‌های استرپتومایسس را برای حذف چهار نوع آفت‌کش ارگانوفسفره به‌طور همزمان بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند سویه مورد این قابلیت را دارد (۱۴). عبادی و همکاران نشان سویه مخمری کاندیداسودولامبیکا را از خاک کشاورزی آلوده به آفت‌کش جدا کردند که قادر به تجزیه زیستی دیازینون بود (۱۵). در مطالعه یاسین و همکاران که با هدف جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کننده دیازینون انجام شد، در مجموع ۱۳ سویه قارچ را از خاک آلوده جدا کردند، اما بیشترین مقدار تجزیه دیازینون توسط ۶ سویه *P. digitatum*, *F. graminearum*, *B. antennata*, *A. niger* و *R. stolonifer* انجام گرفت. از بین این سویه‌ها، مؤثرترین سویه *B. antennata* بود که بیشترین مقدار تجزیه طی ۱۰ روز را انجام داد (۱۶). حمد توانایی، مطالعه‌ای در زمینه نقش قارچ اسپرژیلوس نایجر برای حذف دیازینون در محیط آبی انجام داد. و به این نتیجه رسید اسپرژیلوس با کمترین هزینه و کارایی بالا، قادر به حذف دیازینون است (۸). وانگ و لیو سویه DI-۳

¹Organophosphorus pesticide

کشت تریپتیک سوی براث استفاده شد. ۳۰ گرم از محیط در هر ۱ لیتر آب تهیه گردید. پس از اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه و خنک کردن، سم دیازینون در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان منبع اصلی کربن به ۳ ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت اضافه و ۱ گرم خاک به هر یک از ارلن ها افزوده شد. اطراف ارلن ها برای جلوگیری از تجزیه نوری سم با ورق آلومینیومی پوشانده و ارلن-های حاوی محیط کشت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سپس در شرایط استریل ۱ میلی لیتر (رقت 10^{-4})، ۰/۱ میلی لیتر (رقت 10^{-5}) از ارلن شماره ۲ و ۱ میلی لیتر (رقت 10^{-6})، ۰/۱ میلی لیتر (رقت 10^{-7}) از ارلن شماره ۳ بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار ریخته و کشت داده شد، سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا مقدار رشد باکتری ها مشخص شود. جهت خالص سازی باکتری ها، نمونه های برداشت شده از پلیت ها با روش سفره ای و خطی کشت داده شدند. کلنی های مختلفی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار تشکیل گردید که پس از چند بار کشت، سرانجام کلنی های تک به دست آمد. سپس هر کلنی در محیط کشت جدید خالص سازی شد.

رشد سوبه ها در غلظت های مختلف سم

در این مطالعه ۱۰ لوله آزمایش محیط کشت تریپتیک سوی براث آماده و درون هر لوله ۱۰ میلی لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث و غلظت های مختلف (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر) سم با سمپلر اضافه شد. هر یک از باکتری ها در ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی حل و میزان کدورت آن ها با لوله ۰/۵ مک فارلند کنترل گردید. ۱ میلی لیتر از هر لوله حاوی باکتری به محیط کشت اضافه و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت کشت سفره ای انجام شد.

خصوصیات بیوشیمیایی و ژنوتیپی

جهت شناسایی اولیه باکتری ها از روش بیوشیمیایی (رنگ آمیزی گرم و تست هیدروکسیدپتاسیم^۱) برای شناسایی نهایی باکتری ها از روش مولکولی استفاده گردید. استخراج DNA با استفاده از

از خانواده *Ralstonia* را از خاک کشاورزی جدا کردند که سوبه ذکر شده، قابلیت تجزیه دیازینون را داشت (۱۷). پاندا و همکار تحقیقی در زمینه بررسی تجزیه زیستی یک قارچ کش سرطانزا (کاربندازیم) توسط سوبه باکتری جدید *Bacilluslicheniformis* JTC-۳ جدا شده از پساب کشاورزی انجام دادند. نتایج تحقیق نشان داد این سوبه قابلیت تجزیه سم را دارد (۱۸). وانگ و همکاران مطالعه ای با هدف تجزیه زیستی دیازینون انجام دادند، در این پژوهش یک باکتری تجزیه کننده دیازینون (DI-۶) که قبلاً از خاک آلوده به دیازینون در چین جدا شده بود، بر اساس ویژگی های فیزیولوژی و بیوشیمیایی آن و همچنین با روش تجزیه و تحلیل و توالی rRNA ۱۶S به عنوان *Sphingobium* شناسایی شد. این سوبه قادر به استفاده از دیازینون به عنوان تنها منبع کربن برای رشد توانست ۹۱/۸٪ از ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر دیازینون را در یک بازه زمانی ۶۰ ساعته تجزیه کند. در مطالعه آنها تجزیه سم با دستگاه کروماتوگرافی گازی/طیف سنجی جرمی (GC-MS) سنجیده شد (۱۹). مطالعه حاضر با هدف شناسایی و جداسازی باکتری های تجزیه کننده سم دیازینون از خاک آلوده و سنجش قابلیت تجزیه زیستی آنها انجام شد.

روش کار

نمونه برداری

نمونه ای از خاک یک باغ مرکبات آلوده به دیازینون واقع در استان مازندران، شهرستان تنکابن با مختصات طول جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۵ دقیقه و عرض جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۲ دقیقه گرفته شد. نمونه در فصل بهار و شرایط کاملاً استریل و با استفاده از دستکش جمع آوری گردید؛ بدین صورت که لایه رویی خاک کنار زده و از عمق ۱۰-۰ سانتی متری برداشت و داخل کیسه پلاستیکی غیرقابل نفوذ ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و به آزمایشگاه انتقال یافت (۲۰).

غنی سازی و جداسازی باکتری های تجزیه کننده دیازینون

سم دیازینون مورد استفاده با خلوص ۹۹٪ از شرکت سیگما آلدردیج آلمان خریداری شد. به منظور جداسازی جمعیت های باکتریایی با قابلیت تجزیه دیازینون، از روش غنی سازی در محیط

¹Potassium Hydroxide

اندازه گیری باقی مانده دیازینون

کشت باکتری در خاک

در این پژوهش ۲۰ گرم نمونه خاک به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. سپس درون هر پلیت ۱۰ گرم خاک ریخته و از هر باکتری مورد نظر کشت داده شده در محیط تریپتیک سوی آگار، سوسپانسیونی در محیط تریپتیک سوی برات تهیه و به خاک اضافه گردید. به هر یک از پلیت ها به ترتیب ۱۰ و ۲۰ پی پی ام سم دیازینون اضافه و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. این کشت برای چند باکتری مدنظر جداگانه انجام پذیرفت.

کشت باکتری در محیط برات (مایع)

محیط کشت تریپتیک سوی برات به مقدار ۲۰۰ میلی لیتر تهیه و درون ۲ ارلن به مقدار ۱۰۰ میلی لیتر ریخته شد. به هر یک از ارلن ها به ترتیب ۱۰ و ۲۰ پی پی ام سم دیازینون اضافه گردید. سوسپانسیونی از باکتری مدنظر با غلظت ۰/۵ مک فالند تهیه و به هر یک از ارلن ها افزوده گردید. ارلن ها به مدت ۱۰ روز در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. با توجه به تعداد باکتری ها، برای تمام باکتری این کشت انجام شد.

استخراج باقی مانده دیازینون

برای استخراج آفت کش از محیط برات، ۱۰ میلی لیتر از محیط ارلن برداشت و با آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده و سپس دو بار به مدت نیم ساعت با ۲۰ میلی لیتر، pH هگزان بر روی شیکر قرار داده شد. پس از آن، با استفاده از قیف جدا کننده، فاز آلی از فاز آبی جدا شده و ماده استخراج شده با استفاده از سولفات سدیم بدون آب تیمار شدند تا آب باقی مانده حذف شود. با استفاده از اوپورتور دوار، تحت جریان N_2 در دما ۴۵ درجه سانتی گراد آن را خشک کرده و با استون در حجم ۱۰ میلی لیتر رقیق شد (۲۳). برای استخراج دیازینون در نمونه های خاک، ابتدا به ۵ گرم خاک، ۳ میلی لیتر آب افزوده (۱ دقیقه ورتکس)، سپس ۷ میلی لیتر حلال استونیتریل (۱ دقیقه ورتکس ۴ گرم منیزیم سولفات بدون آب و ۱ گرم سدیم کلرید (مدت ۱ دقیقه ورتکس) و در انتها سانتریفیوژ (۱ دقیقه، ۶۰۰۰ دور در دقیقه) انجام شد. به منظور حذف ناخالصی های احتمالی، خالص سازی با روش استخراج فاز جامد پخش شونده (dSPE)^۱ انجام شد.

کلونی های تک و خالص و توسط کیت شرکت کیاژن طبق دستورالعمل کیت صورت پذیرفت. سپس واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن (اسیدریبونوکلیک ریبوزومی) rRNA ۱۶S انجام گردید. توالی این پرایمرها عبارتند از:

پرایمر برگشتی:

{۱۴۹۲ Revers: ۵'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-۳}

پرایمر رفت:

{۲۷ Forward: ۵'-AGAGTTTGAACMTGGCTCAG-۳}

واکنش زنجیره ای پلیمرز با حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. مواد مصرفی برای واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل: مستر میکس ۲x (Master mix 2x) ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمر ۲۷ F و ۲۷ R از هر کدام ۱ میکرولیتر، آب دیونیزه ۵/۵ میکرولیتر و نمونه ۵ میکرولیتر بود. برنامه واکنش زنجیره ای پلیمرز بدین صورت بود که دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۸/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه صورت گرفت. چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز با ۲ میکرولیتر محلول رنگ مخلوط و درون چاهک ژل آگارز ۱٪ ریخته شد. ژل در دستگاه UVidoc قرار داده شد و موقعیت باندها توسط دستگاه UV ترنس لومیناتور زیر اشعه بررسی گردید. محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تعیین توالی به کره جنوبی فرستاده شد. توالی های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Blast در بانک ژن سایت ncbi با دیگر توالی های موجود در این پایگاه اطلاعاتی مورد مقایسه قرار گرفت (۲۱). یک درخت فیلوژنتیک برای روابط تکاملی بین سوبه ها با استفاده از تجزیه و تحلیل ژنتیک تکاملی مولکولی، نرم افزار مگا (MEGA X) ساخته شد (۲۱).

¹Dispersive solid phase extraction

بیوشیمیایی، سویه‌ها را از نوع گرم منفی شناسایی کرد. دیازینون در غلظت‌های مختلف کشت داده شد که در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام رشد خوبی داشت، ولی در غلظت ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام رشد کمتری از خود نشان داد. شناسایی مولکولی باکتری‌ها با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی *S rRNA* ۱۶ انجام و محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بارگذاری شده در ژل بر باند ۱۵۰۰ قرار گرفت. شکل ۱ نحوه قرارگیری نمونه‌ها در باند موردنظر را نشان می‌دهد. آنالیزهای فیلوژنتیک مولکولی نشان داد سویه R مربوط به جنس *S* سراشیا^۲ و سویه S متعلق به جنس *انتروباکترکلوآکا*^۳ است. سراشیا شباهت ۹۸ درصدی به سراشیا *مارسسنس*^۴ و *انتروباکتر* شباهت ۹۰ درصدی به *انتروباکتر کوبی* *Enterobacter kobei* داشت. در شکل ۲ و ۳ درخت فیلوژنی (تاریخچه تکاملی) با روش نزدیکی، همسایگی^۵ برای سویه‌ها رسم شد. درخت فیلوژنی با طول شاخه ۰/۴ نشان داده شده است. درصد تشابه هرگونه به گونه مورد نظر در تست بوت استرپ جمع شده و در کنار شاخه‌ها قرار دارد.

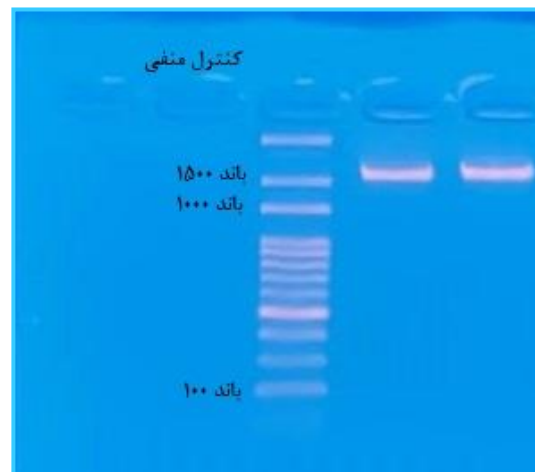
بدین‌منظور، ۱ میلی‌لیتر از روشین حاصل از سانتریفیوژ به لوله‌های فالکن ۱۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم منیزیم سولفات بدون آب، ۲۵ میلی‌گرم آمین اولیه و ثانویه و ۲/۵ میلی‌گرم کربن سیاه گرافیتی منتقل و بعد از تکان دادن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. روشنت حاصل از سانتریفیوژ در دمای اتاق با دمیدن گاز نیتروژن تبخیر گردید (۱).

سپس نمونه‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) با دکتور آشکارساز یونش شعله‌ای (FID)، ستون مویینه مجهز به HP-۵، گاز حامل هیدروژن و نیتروژن، دمای اولیه ستون ۶۰ درجه سانتی‌گراد، دمای نهایی ستون ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد، دمای تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و دمای دکتور ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد مورد سنجش قرار گرفتند (۲۲، ۲۳).

یافته‌ها

جداسازی و شناسایی سویه تجزیه کننده

در کشت اولیه و غنی‌سازی، دو سویه باکتری R و S بیشترین رشد را در غلظت‌های مختلف سم داشتند. نتایج آزمایش



شکل ۱. باندهای مربوط به سویه‌های جدا شده (قطعه و باند ۱۵۰۰)

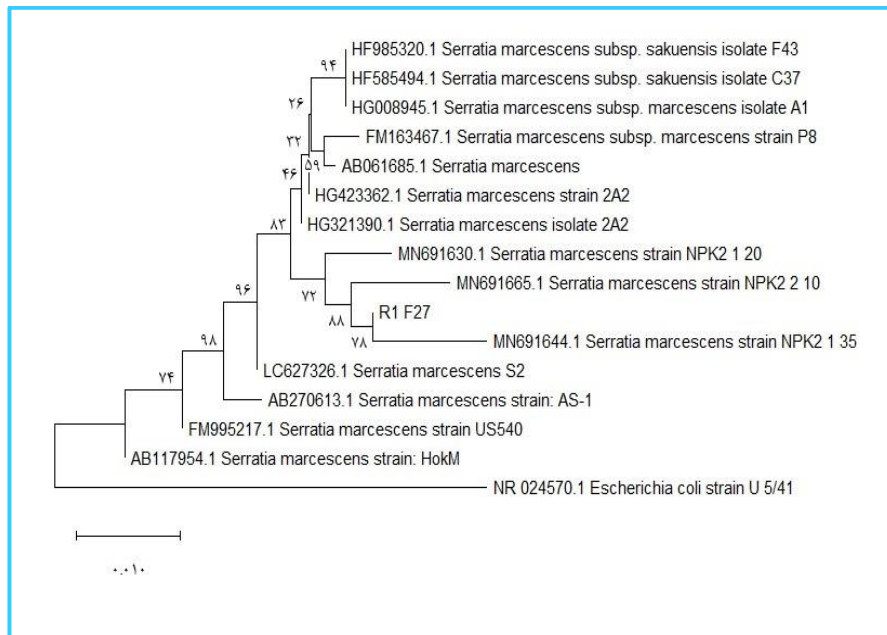
^۲Serratia sp

^۳Enterobacter cloacasp

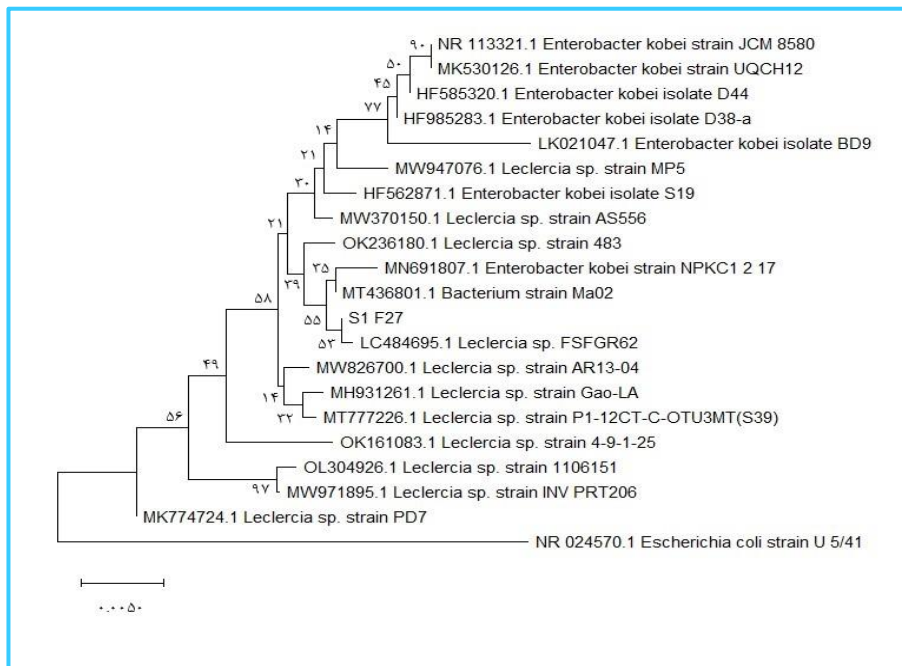
^۴Serrasia marcescens

^۵Neighbor-joining

^۱Gas Chromatography



شکل ۲. درخت فیلوژنی برای سویه سراشیا



شکل ۳. درخت فیلوژنی برای سویه انتروباکتر کلوآکا

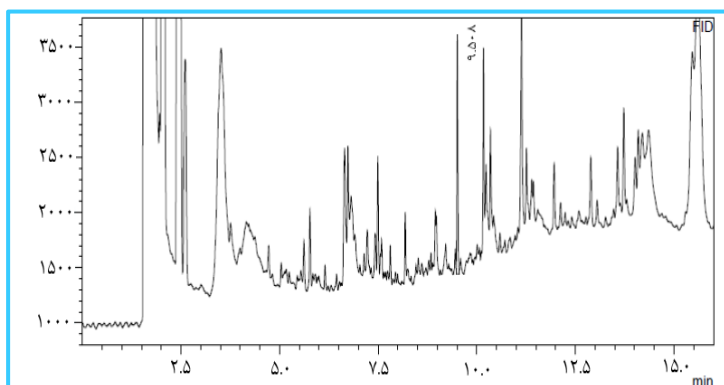
تجزیه دیازینون توسط سویه سراشیا و انتروباکترکلوآکا در کشت مایع و خاک

باقی مانده سم در کشت مایع و جامد باکتری سراشیا و نمودار ۲، باقی مانده دیازینون حاصل از عملکرد انتروباکتر کلوآکا را نشان می دهد. در جدول ۱، نتایج کروماتوگرافی به صورت عدد ارائه شده است.

نمونه ها بعد از آماده سازی به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شدند تا مقدار تجزیه هر یک از باکتری ها اندازه گیری شود. نمودار ۱،

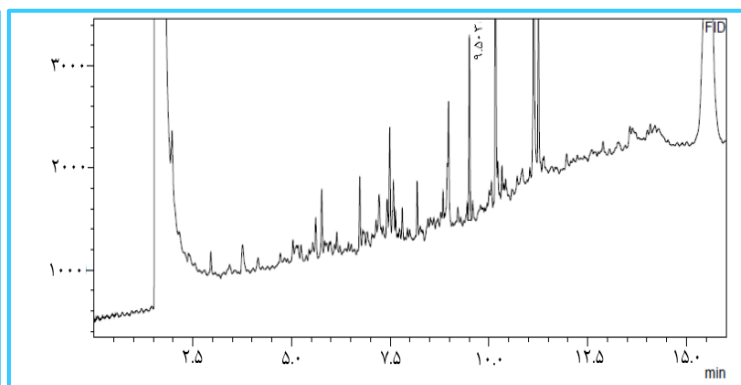
جدول ۱. نتایج تجزیه و مقدار باقی مانده دیازینون

باقی مانده دیازینون	مقدار دیازینون در خاک	باقی مانده دیازینون	مقدار دیازینون در براث	واحد	باکتری
۰/۹۸	۱۰	۳/۵۷	۱۰	پی بی ام	سراشیا
۰/۳۵	۲۰	۴/۳۲	۲۰	پی بی ام	
۶/۸۹	۱۰	۷/۶۹	۱۰	پی بی ام	انتروباکترکلوآکا
۲/۳۹	۲۰	۱۶/۴۱	۲۰	پی بی ام	



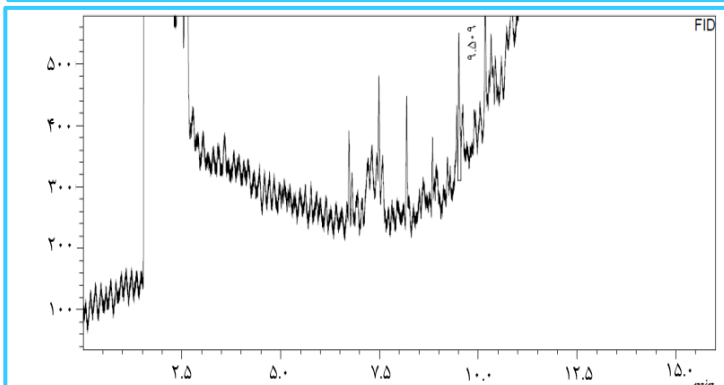
<Peak Table>

پیک #	زمان ماندگاری	مساحت	ارتفاع	غلظت	واحد	نام
۱	۹.۵۰۸	۳۶۶۲	۲۱۶۷	۳.۳۲۷	پی بی ام	دیازینون
کل		۳۶۶۲	۲۱۶۷			



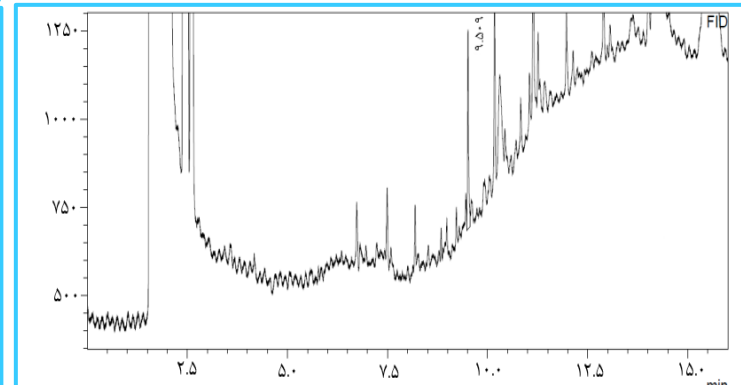
<Peak Table>

پیک #	زمان ماندگاری	مساحت	ارتفاع	غلظت	واحد	نام
۱	۹.۵۰۳	۳۰۸۲	۱۸۰۴	۳.۵۷۶	پی بی ام	دیازینون
کل		۳۰۸۲	۱۸۰۴			



<Peak Table>

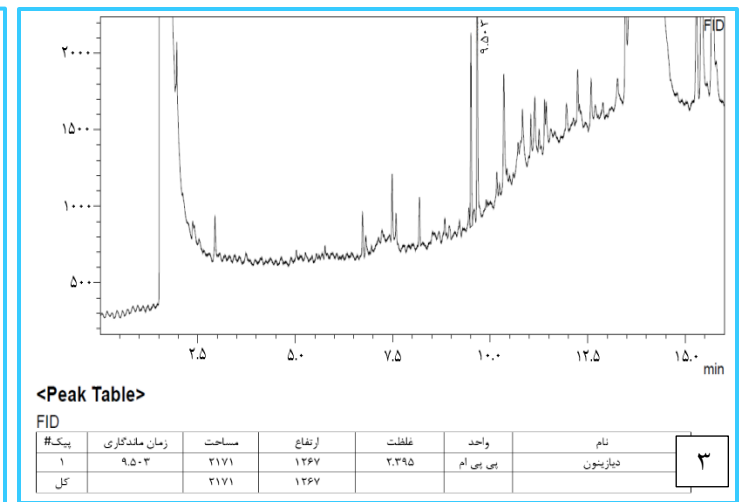
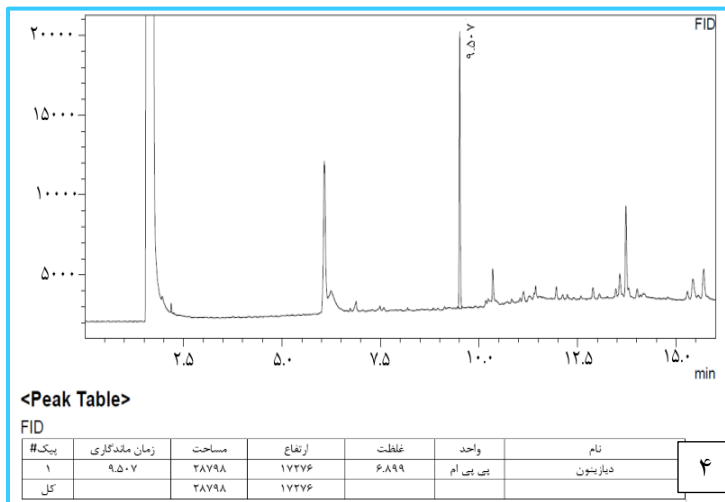
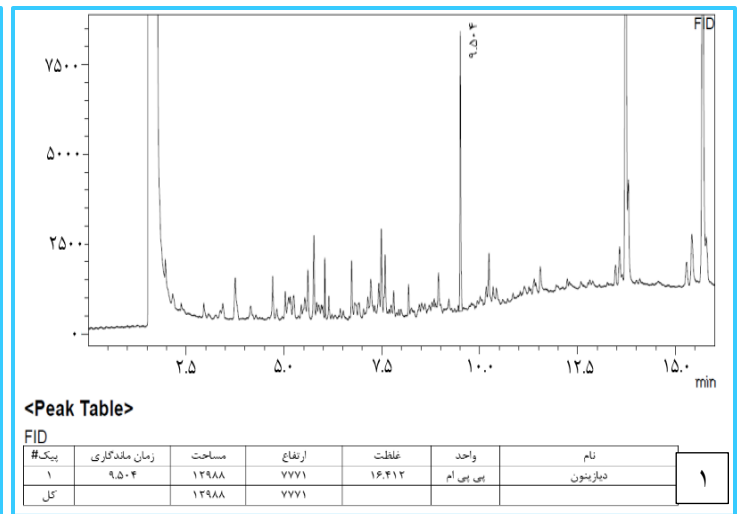
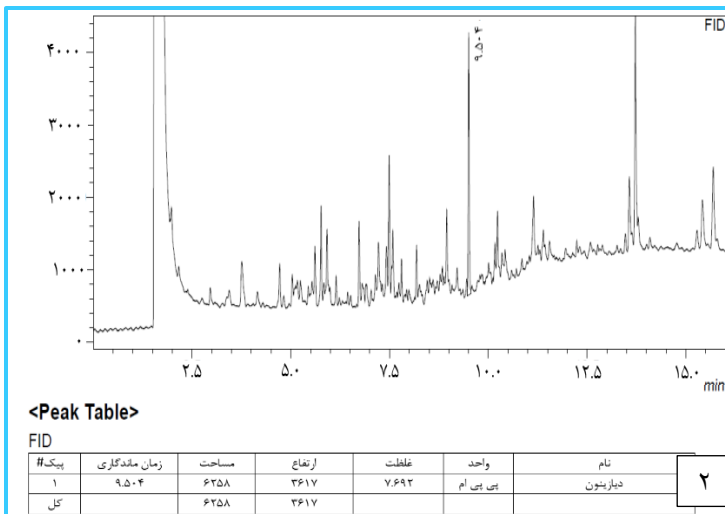
پیک #	زمان ماندگاری	مساحت	ارتفاع	غلظت	واحد	نام
۱	۹.۵۰۹	۵۹۴	۲۴۰	۰.۳۵۱	پی بی ام	دیازینون
کل		۵۹۴	۲۴۰			



<Peak Table>

پیک #	زمان ماندگاری	مساحت	ارتفاع	غلظت	واحد	نام
۱	۹.۵۰۹	۱۰۷۹	۵۶۵	۰.۹۸۱	پی بی ام	دیازینون
کل		۱۰۷۹	۵۶۵			

نمودار ۱. تجزیه دیازینون توسط باکتری Serratiasp در محیط براث و خاک با غلظت ۱۰ و ۲۰ پی بی ام



نمودار ۲. تجزیه دیازینون توسط باکتری آنتروباکترکلوآکا در محیط براث و خاک با غلظت ۱۰ و ۲۰ پی پی ام

در غلظت ۱۰ و ۲۰ پی پی ام در محیط براث ۱/۲۳٪ و ۱۷/۹۵٪ و در کروماتوگرام ۳ و ۴ محیط خاک به ترتیب ۳۱/۱۹٪ و ۸۸/۰۵٪ تجزیه انجام گرفت. هر دو باکتری توانایی و قابلیت تجزیه دیازینون را دارا بودند، اما در محیط خاکی این قابلیت بیشتر بود. این موضوع نشان می دهد در نمونه ها کاهش غلظت آفت کش در اثر فعالیت باکتری و استفاده آفت کش موجود در محیط به عنوان منبع کربن و فسفر توسط جدایه ها است. تاکنون مطالعات زیادی در زمینه شناسایی باکتری های تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره انجام شده است. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعه ابوعامر و همکاران در مورد تجزیه بیولوژیکی دیازینون توسط سویه Serratia marcescens DI۱۰۱ مورد

بحث

کروماتوگرام مربوط به تزریق، استاندارد آفت کش دیازینون به دستگاه GC و زمان بازداری این آفت کش را نشان می دهد. در این تحقیق زمان بازداری برای تمام غلظت ها ۹/۵ دقیقه بود و نمونه ها ۱۰ روز در محیط کشت نگهداری شدند. کروماتوگرام های مربوط به سراسپا نشان داد مقدار مصرف سم و تجزیه آن در غلظت کروماتوگرام ۱ و ۱۰ پی پی ام و کروماتوگرام ۲ و ۲۰ پی پی ام محیط براث توسط باکتری سراسپا به ترتیب ۳/۶۴٪ و ۳/۷۸٪ و در کروماتوگرام ۳ و ۴ محیط خاک در همین غلظت ۲/۹۰٪ و ۲۵/۹۸٪ به دست آمد. همین مقدار دوز مصرفی برای باکتری آنتروکلوآکا تزریق شد و کروماتوگرام ۱ و ۲

دیازینون و سایر سموم ارگانوفسفره می‌تواند کاندیدای بالقوه برای پاک‌سازی زیستی خاک و آب آلوده معرفی شود، زیرا قابلیت رشد در غلظت بالای آفت‌کش را دارد. مطالعات بیشتری برای بررسی کاربرد بالقوه باکتری‌ها برای پاک‌سازی زیستی محیط‌های آلوده به دیازینون مورد نیاز است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند. همچنین هرگونه تضاد منابع حقیقی یا مادی که ممکن است بر نتایج یا تفسیر مقاله تأثیر بگذارد را رد می‌کنند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دکترا با کد طرح ۱۶۲۲۹۰۸۴۶ می‌باشد. بدین‌وسیله از کارکنان و مسئولین آزمایشگاه میکروبیولوژی و باکتری‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به دلیل حمایت‌هایی که در جهت انجام این تحقیق داشتند، تشکر و قدردانی می‌شود.

مقایسه قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد سراشیا قابلیت تجزیه بالایی دارد و در مدت ۱۶ روز، بالای ۹۵٪ سم را تجزیه کرد. در مطالعه حاضر نیز سراشیا در محیط خاک، بالای ۹۰٪ تخریب را داشت.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر مانند تمام تحقیقات در این زمینه، با هدف کاهش آلودگی ناشی از سموم توسط عوامل میکروبی انجام شد، با این تفاوت که هم زمان درصد تجزیه در محیط مایع و خاک بررسی گردید. نتایج نشان داد که باکتری‌ها، قابلیت سازگاری با دیازینون را دارند. با توجه به نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی، هر دو باکتری سراشیا و انتروباکتر قابلیت تجزیه و مصرف دیازینون را به‌عنوان منبع کربن داشتند، در نتیجه آلودگی حاصل از آفت‌کش‌ها مانع رشد باکتری در محیط‌های آلوده نشد و باکتری‌ها از آفت‌کش در محیط‌های غذایی ضعیف به‌عنوان منبع انرژی استفاده کردند. هر دو باکتری در محیط خاک قابلیت تجزیه بیشتری نسبت به محیط مایع داشت. جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های موردنظر به‌عنوان سویه توانمند در تجزیه

References

- Esfandian H. Removal of Organophosphorus insecticide Diazinon from aqueous solution by synthetic zeolite sodalite.[Doctorate Thesis]. Iran.Faculty of Chemical Engineering, Gas and Petroleum, Semnan University; 2016. (Persian)
- Ghanbari F, Monavari M, Moattar F. Compare Diazinon Concentrations in Soil Sample of Different Area of Rice Paddies in Rasht. fourth international conference on new findings in agricultural sciences,natural resources and environment 2018. (Persian)
- Liu T, Xu S, Lu S, et al. A review on removal of organophosphorus pesticides in constructed wetland: performance, mechanism and influencing factors. Science of The Total Environment 2019;651:2247-2268.
- Zhao M-a, Gu H, Zhang C-J, et al. Metabolism of insecticide diazinon by Cunninghamella elegans ATCC36112. RSC advances 2020;10(33):19659-19668.
- Aswathi A, Pandey A, Sukumaran RK. Rapid degradation of the organophosphate pesticide- Chlorpyrifos by a novel strain of Pseudomonas nitroreducens AR-3. Bioresource technology 2019;292:122025.
- Hassanshahian M. Isolation and characterization of diazinon degrading bacteria from contaminated agriculture soils. Iranian Journal of Toxicology 2016;10(4):13-20.
- Amani F, Safari Sinegani AA, Ebrahimi F, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and diazinon organophosphates by two bacteria isolated from contaminated agricultural soils. Biological Journal of Microorganism. 2018;7(28):27-39.
- Hamad MTMH. Biodegradation of diazinon by fungal strain *Apergillus niger* MK640786 using response surface methodology. Environmental Technology & Innovation 2020;18:100691.
- Alipour A, Alizadeh A, Khodaygan P. Evaluation of diazinon pesticide biodegradation by isolated indigenous bacteria from contaminated soil. Biological Journal of Microorganism 2018;7(26):73-86.(Persian)
- Shabbir M, Singh M, Maiti S, et al. Removal enactment of organo-phosphorous pesticide using bacteria isolated from domestic sewage. Bioresource technology 2018;263:280-288.

11. Szewczyk R, Rozalska S, Mironenka J, et al. Atrazine biodegradation by mycoinsecticide *Metarhizium robertsii*: Insights into its amino acids and lipids profile. *Journal of environmental management* 2020;262:110304.
12. Fattahi E, Ostovar N, Kaboosi H. Isolation and Characterization of Chlorpyrifos-Degrading Bacteria from Rice Field Soils in Amol City, Iran. *Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research*. 2017;15(1):73-82.(Persian)
13. Nasrollahi M, Pourbabaei AA, Etesami H, et al. Diazinon degradation by bacterial endophytes in rice plant (*Oryzia sativa* L.): a possible reason for reducing the efficiency of diazinon in the control of the rice stem-borer. *Chemosphere*2020;246:125759.
14. Briceño G, Schalchli H, Mutis A, et al. Use of pure and mixed culture of diazinon-degrading *Streptomyces* to remove other organophosphorus pesticides. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2016;114:193-201.
15. Ebadi T, Najafpour GD, Younesi H, et al. Rapid biodegradation of diazinon using a novel strain of *Candida pseudolambica*. *Environmental Technology & Innovation* 2022;25:102218.
16. Mostafa AA-F, Yassin MT, Dawoud TM, et al. Mycodegradation of diazinon pesticide utilizing fungal strains isolated from polluted soil. *Environmental Research* 2022;212:113421.
17. Wang G, Liu Y. Diazinon degradation by a novel strain *Ralstonia* sp. DI-3 and X-ray crystal structure determination of the metabolite of diazinon. *Journal of biosciences*. 2016;41(3):359-66.
- 18-Panda J, Kanjilal T, Das S. Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide Carbendazim by *Bacillus licheniformis* JTC-3 from agro-effluent. *Biotechnology Research and Innovation*. 2018;2(1):45-57.
19. Wang G, Li X, Zheng J, et al. Isolation of a diazinon-degrading strain *Sphingobium* sp. DI-6 and its novel biodegradation pathway. *Frontiers in Microbiology*.2022;13.
20. Ghafari M, Hassanshahian M, Mahani M. Isolation and characterization of Fenitrothion-degrading bacteria from pestachio gardens in Kerman Provinance. *Biological Journal of Microorganism*. 2014;3(10):51-64.(Persian)
21. Sasikala C, Jiwal S, Rout P, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012;28(3):1301-1308.
22. Abo-Amer AE. Biodegradation of diazinon by *Serratia marcescens* DI101 and its use in bioremediation of contaminated environment. *Journal of microbiology and biotechnolog* 2011;21(1):71-80.
23. Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine pollution bulletin* 2012;64(1):7-12.