Evaluation of organophosphorus pesticide biodegradation by halophilic bacteria

Shokufeh Rafieyan
MSc of Microbiology, University of Tehran, Tehran, Iran, sh.rafieyan@ut.ac.ir
Mohammad Ali Amoozegar *
Professor of Microbiology, University of Tehran, Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir
Mahmoud Shavandi
Assistant Professor of Biotechnology, Ecology and Environmental Pollution Control Research Group, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Iran, shavandim@Ripi.Ir
Hojjat Kazemi
Assistant Professor of Analytical Chemistry, Analytical Chemistry Research Group, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Iran, kazemiho@ripi.ir
Mehdi Bamorowat
PhD Student in Analytical Chemistry, GYAH Corporation, Tehran, Iran. mbamorowat@gmail.com

Archive of SID

Abstract

Introduction: Organophosphorus pesticides are used extensively in agriculture. Most of them are released into the environment and have harmful effects on the health of ecosystems, wildlife and humans. Due to the increase of the salinity in the agriculture, especially drainage waters and the need for cleaning and reuse of the water due to water shortages, there is an increased demand for new treatment techniques. Bioremediation is the efficient and environmentally friendly way and can be used to remove these contaminants.

Materials and methods: Halophilic bacteria that have the ability to use organophosphorus pesticide chlorpyrifos as the sole source of carbon, were isolated through targeted enrichment. Based on the higher growth and tolerance in the presence of the pesticide, one isolate was selected. The ability of the selected strain to degrade chlorpyrifos was examined by gas chromatography-mass spectrometry analysis. The strain was identified by molecular method. To determine the optimal growth conditions, as an indicator of optimal pesticide removal, factors such as temperature, pH, concentration of salt and chlorpyrifos in the presence of pesticide (sole source of carbon) were examined.

Results: The selected isolate named CDB5 showed 25.23% removal of chlorpyrifos in the basic conditions without addition of growth factors in 10 days. The molecular identification revealed that this halophilic strain belongs to the genus *Halomonas* sp. Investigation of the effect of factors in the presence of chlorpyrifos as the sole source of carbon showed that the strain has the highest growth at temperature 35℃, pH7, salt concentration of 10% and the chlorpyrifos concentration of 600 mg/l.

Discussion and conclusion: Halophilic bacteria due to compatibility with the salty condition, can be a good option for the removal of organophosphorus pesticides in the contaminated salty environments.

Key words: Halophiles, Pesticides, Chlorpyrifos, Bioremediation, GC-MS

* Corresponding author
Received: January 9, 2016 / **Accepted:** March 12, 2017

www.SID.ir

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۵، بهار ۱۳۹۷، صفحه ۱- ۱۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۲

ارزیابی تجزیه زیستی آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته توسط باکتری‌های نمک‌دوست

شکوفه رفیعیان: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، sh.rafieyan@ut.ac.ir
محمدعلی آموزگار *: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir
محمود شوندی: استادیار بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، shavandim@ripi.ir
سیدحجت‌الله کاظمی: استادیار شیمی تجزیه، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران، kazemiho@ripi.ir
مهدی بامروت: دانشجوی دکتری شیمی تجزیه، مجتمع آزمایشگاهی شرکت گیاه، تهران، ایران، mbamorowat@gmail.com

چکیده

مقدمه: آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته به‌شکل گسترده در کشاورزی استفاده و درصد زیادی از آنها به محیط‌زیست رها می‌شوند و آثار مضری بر سلامت اکوسیستم‌ها، حیات وحش و انسان‌ها می‌گذارند. با توجه به روند افزایش شوری در بخش کشاورزی به‌ویژه شوری زه‌آب‌ها و نیاز به پاکسازی و استفاده دوباره این آب‌ها به دلیل مشکل کم آبی، تقاضا برای روش‌های تیمار جدید رو به افزایش است. پاکسازی زیستی روشی کارآمد و سازگار با محیط‌زیست است که برای حذف این آلاینده‌ها استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها: روش غنی‌سازی هدفمند برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست با قابلیت تجزیه آفت‌کش ارگانوفسفاته کلرپیریفوس استفاده و سویه برتر با توجه به بیشترین رشد و تحمل‌پذیری در حضور آفت‌کش انتخاب شد. توانایی سویه منتخب در تجزیه آفت‌کش با تحلیل کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی سنجیده و شناسایی سویه به روش مولکولی انجام شد. شرایط بهینه رشدی که شرایط تجزیه بهتر را نشان دهد، با بررسی اثر فاکتورهای دما، اسیدیته، درصد نمک و غلظت کلرپیریفوس بر رشد در حضور آفت‌کش (تنها منبع کربن) بررسی شد.

نتایج: سویه منتخب با کد CDB5 در محیط پایه معدنی و بدون محرک رشد، ۲۵/۲۳ درصد کلرپیریفوس را طی ۱۰ روز تجزیه کرد. با شناسایی مولکولی مشخص شد که این سویه نمک‌دوست به جنس *Halomonas* sp. تعلق دارد. بررسی اثر فاکتورها در حضور کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) نشان داد که سویه منتخب، بیشترین رشد را در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷، نمک ۱۰ درصد و غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرپیریفوس دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: باکتری‌های نمک‌دوست به علت سازگاری با شرایط نمکی، گزینه مناسبی برای حذف آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته در محیط‌های آلوده شور هستند.

واژه‌های کلیدی: نمک‌دوست‌ها، آفت‌کش‌ها، کلرپیریفوس، پاکسازی زیستی، کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی

* نویسنده مسؤول مکاتبات، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بحران آلودگی زیست‌محیطی یکی از مهم‌ترین مشکلات در جهان است. رشد روزافزون جمعیت، صنعتی‌شدن و گسترش شهرنشینی و در نتیجه استفاده غیراصولی از منابع طبیعی و تولید ترکیبات زنوبیوتیک[1]، مشکلات زیست‌محیطی فراوانی ازجمله آلودگی هوا، آب و اکوسیستم‌ها، آثار مضر بر موجودات زنده مختلف و تخریب چرخه‌های بیوژئوشیمیایی ایجاد کرده‌اند که تهدیدی برای سلامت انسان محسوب می‌شوند. سالانه تعداد زیادی آلاینده به محیط‌زیست وارد می‌شوند و میلیون‌ها انسان را در معرض خطر بیماری و مرگ قرار می‌دهند (۱-۳).

در کشاورزی مدرن، سالانه میلیون‌ها تن آفت‌کش برای کنترل آثار مضر موجودات هدف و در نتیجه افزایش تولید استفاده می‌شوند و تخمین زده شده است که کمتر از ۵ درصد این ترکیبات به موجودات هدف می‌رسند. نگرانی محیطی اصلی استفاده از آفت‌کش‌ها، قابلیت شسته‌شدن آنها به لایه‌های خاک و آلوده‌کردن آب‌های زیرزمینی و یا در صورت غیرمتحرک‌بودن، مقاومت زیاد در خاک و تجمع تا سطح سمی و زیان‌آور برای ریزموجودات، گیاهان، حیوانات و انسان‌هاست (۴).

آفت‌کش‌ها بر اساس ساختار شیمیایی به دو گروه آلی و غیرآلی دسته‌بندی می‌شوند. در حال حاضر، پراستفاده‌ترین آفت‌کش‌ها در گروه آفت‌کش‌های آلی به ارگانوفسفاته‌ها تعلق دارند. این آفت‌کش‌ها به‌طورگسترده برای کنترل آفت‌های کشاورزی و خانگی در جهان استفاده و حدود ۳۸ درصد کل آفت‌کش‌هایی که در جهان استفاده می‌شوند را به خود اختصاص می‌دهند (۲ و ۵).

همه ترکیبات ارگانوفسفاته (OP) ساختارهای شیمیایی و مکانیسم‌های سمیت مشابهی دارند. ترکیبات ارگانوفسفاته از شکسته‌شدن استیل‌کولین در سیناپس‌ها و غشاهای سلولی گلبول قرمز ممانعت می‌کنند؛ استیل‌کولین یک جز حیاتی سیستم عصبی است و انتقال ایمپالس‌های عصبی را در مغز، سیستم‌های اسکلتی و ماهیچه‌ای ممکن می‌کند (۶).

ترکیبات ارگانوفسفره با اتصال کوالان به آنزیم از فعالیت طبیعی استیل‌کولین‌استراز جلوگیری می‌کنند و ساختار و عملکرد آن را تغییر می‌دهند که به تجمع استیل‌کولین در سیناپس‌ها منجر می‌شود. سپس اعصاب بیش از حد تحریک و متراکم می‌شوند. این ممانعت باعث تشنج، فلج و در نهایت مرگ حشرات و پستانداران می‌شود (۲ و ۷).

کلرپیریفوس (O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)- phosphorothioate) یکی از پراستفاده‌ترین آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته است که برای محافظت طیف گسترده‌ای از محصولات همچون میوه‌ها، سبزیجات، غلات، قارچ خوراکی و پنبه و همچنین در برابر حشره‌های آفت خانگی و مربوط به دام استفاده می‌شود (۸ و ۹). استفاده زیاد از کلرپیریفوس، هوا، آب‌های زیرزمینی، رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و آب باران را آلوده می‌کند و آلودگی حاصل تا ۲۴ کیلومتری محل استفاده یافت می‌شود (۱۰). تخمین زده شده که این آفت‌کش عامل حدود ۳ میلیون مسمومیت و حدود ۲۰۰ هزار مرگ در سال است (۱۱). کلرپیریفوس به‌نسبت در خاک پایدار و نیمه عمر آن در خاک از چند روز تا ۴ سال بر اساس سرعت کاربرد، نوع اکوسیستم، ریزموجودات خاک و شرایط اقلیمی متغیر است (۱۲). این آفت‌کش‌ها برای محیط‌زیست خطرناک هستند و

Archive of SID

www.SID.ir

پاکسازی محیط از آنها اهمیت ویژه‌ای دارد.

فناوری‌های استفاده‌شده برای پاکسازی محیط‌زیست شامل فرایندهای فیزیکی، شیمیایی یا زیستی هستند که برای حذف، کاهش، جداسازی و یا تثبیت آلاینده یا گروهی از آلاینده‌ها به کار می‌روند (۱۳). استفاده از موجودات زنده به‌ویژه ریزموجودات برای تجزیه آلاینده‌های محیطی به شکل‌های با سمیت کمتر، پاکسازی زیستی[۲] نامیده می‌شود. در این روش، از باکتری‌ها، قارچ‌ها یا گیاهان برای تجزیه یا سمیت‌زدایی ترکیبات خطرناک برای سلامت انسان و یا محیط‌زیست استفاده می‌شود (۱۴).

تجزیه کلرپیریفوس در خاک به‌شکل شیمیایی و فعالیت میکروبی به‌طورگسترده مطالعه شده است (۱۵). تاکنون، ریزموجودات بسیاری با توانایی تجزیه کلرپیریفوس از جنس‌های مختلف جداسازی شده‌اند، اما مسیر تجزیه کلرپیریفوس در بیشتر سویه‌های معرفی‌شده مشخص نشده است.

شوری خاک یکی از مشکلات عمده در بخش کشاورزی ایران است (۱۶). همچنین زه‌آب‌ها به دلیل خروج از زمین‌های کشاورزی، حاوی انواع سموم و مواد محلول و شوری بسیار هستند.

با توجه به مشکلات افزایش شوری و آلودگی بقایای آفت‌کش‌ها در خاک و زه‌آب‌های بخش کشاورزی، در پژوهش حاضر توانایی باکتری‌های بومی کشور در تجزیه آفت‌کش‌های متداول ارگانوفسفاته بررسی شد. به این منظور، باکتری‌های نمک‌دوست تجزیه‌کننده بومی جداسازی و میزان توانایی آنها برای تجزیه این ترکیبات سمی به‌عنوان راهکاری برای پاکسازی زیستی آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی و جداسازی: ۳ نمونه خاک کشاورزی، ۱ نمونه آب کشاورزی و ۱ نمونه پساب کارخانه تولیدکننده آفت‌کش برای غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌ها استفاده شدند. ابتدا ویژگی‌های نمونه‌ها شامل هدایت الکتریکی، میزان نمک‌های محلول، شوری و اسیدیته با دستگاه هفت‌کاره MultiSeven اندازه‌گیری شد؛ به این منظور، از نمونه‌های خاک به نسبت ۰/۱ (وزنی/حجمی) رقت تهیه شد و سپس ویژگی‌های یادشده اندازه‌گیری شدند. غنی‌سازی در سه مرحله ۱۴ روزه انجام و در این مراحل، محیط پایه معدنی M9 اصلاح‌شده با اسیدیته ۷ استفاده شد. اصلاح این محیط با حذف منبع کربنی گوکز و افزودن ۵ درصد (وزنی/حجمی) NaCl برای ایجاد شرایط نمکی و افزودن محلول ریزمغذی فنینگ و لیپرت[۳] (۱۷) انجام شد. کلرپیریفوس تکنیکال با خلوص ۹۶/۸ درصد از شرکت تولید آفت‌کش گیاه[۴] تهیه و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلرپیریفوس به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. ترکیب محیط‌کشت M9 اصلاح‌شده شامل ۵۰گرم NaCl، ۱ گرم KH_2PO_4، ۱ گرم K_2HPO_4، ۱ گرم NH_4Cl در لیتر و ۲ میلی‌لیتر $MgSO_4$ یک مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر $CaCl_2$ یک مولار در لیتر بود. ترکیب محلول ریزمغذی فنینگ و لیپرت برای تقویت رشد، عبارت بود از: ۵۰۰ میلی‌گرم $Na_2EDTA.2H_2O$، ۲۰۰ میلی‌گرم $FeSO_4.7H2O$، ۱۰ میلی‌گرم $ZnSO_4.7H_2O$، ۳ میلی‌گرم $ZnSO_4.7H_2O$، ۲۰ میلی‌گرم $CoCl_2.6H_2O$، ۳۰ میلی‌گرم H_3BO_4، ۲ میلی‌گرم $CuCl_2.6H_2O$ و ۳ میلی‌گرم $Na_2MO_4.2H_2O$ در ۱۰۰ میلی‌لیتر. اسیدیته محیط‌کشت با محلول‌های ۱ مولار Tris base و HCl، ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شد.

Archive of SID

www.SID.ir

برای جلوگیری از رسوب، استوک‌های ۱ مولار کلریدکلسیم و منیزم‌سولفات جداگانه تهیه، استریل و به محیط‌کشت تهیه‌شده اضافه شدند. استوک کلرپیریفوس با استفاده از نمونه تکنیکال به‌شکل محلول در استون و با در نظرگرفتن درصد خلوص ۹۶/۸ تهیه و به اندازه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پس از اتوکلاوشدن محیط‌کشت به آن اضافه شد. برای اطمینان از تبخیر استون پس از اضافه‌کردن استوک کلرپیریفوس، محیط‌های مایع تهیه‌شده ۱ روز زیر هود قرار داده شدند و سپس نمونه‌های خاک به میزان ۱ درصد وزنی/حجمی و نمونه آب به میزان ۱ درصد حجمی/حجمی به آنها اضافه شدند. ارلن‌ها ۱۴ روز در شیکرانکوباتور با دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. برای جلوگیری از تجزیه نوری آفت‌کش، فضای شیکرانکوباتور تاریک شد. پس از سپری‌شدن مدت گرماگذاری، فرایند غنی‌سازی با انتقال ۱ میلی‌لیتر از نمونه به محیط‌کشت جدید انجام و ۳ بار تکرار شد.

برای جداسازی باکتری‌ها از محیط مایع غنی‌شده، از محیط R2A با ترکیب ۰/۵ گرم Proteose peptone، ۰/۵ گرم Casamino acid، ۰/۵ گرم Yeast extract، ۰/۵ گرم Dextrose، ۰/۵ گرم Soluble starch، ۰/۰۵ گرم Magnesium sulphate، ۰/۳ گرم Sodium pyruvate، ۰/۳گرم Dipotassium phosphate و ۱۵ گرم agar در لیتر استفاده شد. برای حفظ شرایط نمکی، مقدار ۵ درصد (وزنی/حجمی) NaCl به محیط اضافه شد. اسیدیته محیط با محلول ۲ مولار NaOH، ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم شد. برای افزایش احتمال جداسازی باکتری از دو روش کشت خطی و تهیه سریال رقت و کشت روی محیط جامد استفاده شد.

پس از ظهور کلنی‌ها روی پلیت‌ها، خالص‌سازی جدایه‌ها با چندین مرحله تجدید کشت روی محیط جامد انجام شد. از واکنش رنگ‌آمیزی گرم برای تأیید خلوص کلنی‌ها و تعیین شکل میکروسکوپی هریک از آنها و از آزمون KOH ۳ درصد (وزنی/حجمی) برای تأیید نتایج رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد (۱۷).

غربال‌گری و بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه‌ها: برای بررسی و تأیید توانایی رشد جدایه‌ها در حضور کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) از محیط مایع M9 اصلاح‌شده حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلرپیریفوس استفاده شد. پس از تهیه کشت تازه هر جدایه در محیط جامد، از هر کدام آنها کدورتی برابر با کدورت نیم مک فارلند در آب نمک ۵ درصد (وزنی/حجمی) تهیه و سپس به میزان ۳ درصد (حجمی/حجمی) به محیط‌های مایع تلقیح شد و ۱۴ روز در شیکر انکوباتور گرماگذاری شدند. پس از گذشت زمان یادشده، مشاهده کدورت در مقایسه با نمونه شاهد، توانایی تجزیه کلرپیریفوس در نظر گرفته شد و برای انتخاب جدایه‌های توانمند، مرحله پیش با افزایش میزان کلرپیریفوس به ۱۰۰ میلی گرم در لیتر انجام و جدایه‌های دارای کدورت بیشتر انتخاب شدند.

انتخاب جدایه برای مراحل بعد با بررسی تحمل‌پذیری جدایه‌ها در حضور غلظت‌های مختلف کلرپیریفوس (۱۰۰ تا ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر) در محیط مایع R2A به اضافه ۵ درصد NaCl انجام شد؛ به این منظور، پس از تلقیح جدایه‌ها در محیط مایع با غلظت‌های مختلف آفت‌کش، گرماگذاری در ۳۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط‌های مایع دارای غلظت‌های مختلف آفت‌کش برداشته و روی محیط جامد R2A به اضافه ۵ درصد NaCl کشت داده شد. سپس رشدکردن یا

Archive of SID

www.SID.ir

نکردن جدایه‌ها در هر غلظت آفت‌کش کلرپیریفوس با گرماگذاری در ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته بررسی شد.

میزان رشد جدایه‌ها در محیط پایه معدنی در حضور ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) بررسی شد. با توجه به رشد بسیار کم جدایه‌ها و ممکن نبودن استفاده از اندازه‌گیری جذب نوری (OD) برای بررسی میزان رشد جدایه‌ها، از روش شمارش تعداد باکتری‌ها در محیط R2A به اضافه ۵ درصد NaCl استفاده شد. شمارش با تهیه سریال رقت از نمونه و برداشتن و پخش‌کردن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف روی محیط جامد و گرماگذاری پلیت‌ها در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. در نهایت جدایه دارای بیشترین رشد در حضور آفت‌کش (تنها منبع کربن) برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شد.

برای بررسی ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه‌های انتخاب‌شده در مرحله غربال‌گری، فعالیت اکسیدازی با استفاده از دیسک‌های اکسیداز شرکت پادتن طب و فعالیت کاتالازی با استفاده از محلول هیدروژن‌پراکسید ۳ درصد (حجمی/حجمی) بررسی شد (۱۷).

برای بررسی محدوده نمک لازم برای رشد جدایه‌ها، از محیط SW با درصدهای مختلف نمک صفر تا ۲۵ درصد حاوی ۰/۵ درصد عصاره مخمر استفاده شد (۱۸). ترکیب محیط ۳۰ درصد SW (گرم در لیتر) عبارت بود از: ۲۳۴ گرم NaCl، ۳۹ گرم $MgCl_2.6H_2O$، ۱ گرم $CaCl_2$، ۶۱ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۶ گرم KCl، ۰/۲ گرم $NaHCO_3$ و ۰/۷ گرم KBr در لیتر.

محیط یادشده برای یافتن درصدهای لازم به نسبت‌های مختلفی رقیق شد و ۰/۵ درصد عصاره مخمر برای تأمین ماده مغذی به محیط SW اضافه شد. تحمل پذیری نمک یا نمک‌دوست‌بودن جدایه‌ها به ترتیب با رشدکردن یا نکردن آنها در محیط بدون نمک تعیین شد.

شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنتیک سویه منتخب: برای استخراج DNA باکتری‌ها از روش اصلاح‌شده استخراج DNA پیشنهادی مارمور[5] استفاده شد (۱۹). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای عمومی باکتری‌ها
(5´-AGAGTTTGATCMTGGGTCAG-3´) 27F
و
(5´-GGTTACCTTGTTACGACTT-3´) 1492R
انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۶ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله تکثیر به‌شکل ۳۰ چرخه تکرارشونده با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه)، دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه)، دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی گراد (۶۰ ثانیه) و در نهایت مرحله سنتز نهایی برای تکمیل ساختارهای تکثیرشونده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. نمونه تکثیرشده برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. توالی حاصل با نرم افزار ChromasPro بررسی و سپس توالی آن با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی EzTaxon مقایسه شد. سپس تحلیل فیلوژنتیک سویه منتخب و سویه‌های نزدیک به آن با نرم‌افزارهای Bioedit و Mega6 انجام و درخت فیلوژنتیک مربوط به آنها با روش Neghiborjoining رسم شد (۱۹).

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی میزان تجزیه آفت‌کش توسط سویه منتخب

آماده‌سازی نمونه: برای بررسی میزان تجزیه کلرپیریفوس توسط سویه منتخب، از محیط مایع پایه معدنی M9 اصلاح‌شده دارای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) استفاده شد. گرماگذاری ارلن‌ها در شیکرانکوباتور با فضای تاریک و دمای ۳۴ درجه سانتی گراد با چرخش ۱۵۰دور در دقیقه انجام شد. برای مقایسه و بررسی میزان تجزیه، نمونه تلقیح‌نشده‌ای با شرایط مشابه در نظر گرفته شد و هم‌زمان با نمونه اصلی گرماگذاری شد. پس از گذشت ۱۰ روز، ارلن‌ها از شیکر خارج شدند تا استخراج مایع-مایع با استفاده از حلال و تخلیص کلرپیریفوس از محیط انجام شود.

استخراج مایع-مایع[۶] کلرپیریفوس: از سیستم حلالی اتیل‌استات: فسفریک‌اسید (۳:۹۷)، توصیه‌شده لاکشمی[۷] و همکاران برای استخراج کلرپیریفوس از محیط مایع استفاده شد(۲۰). مقدار ۱۰ میلی لیتر از سیستم حلالی یادشده به محیط مایع اضافه و ۲ ساعت در شیکر ۳۷ درجه سانتی گراد با چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس با قیف جداکننده[۸]، فاز آبی از فاز آلی جدا و فاز آلی برای مراحل بعدی استفاده شد. برای تبخیر حلال از دستگاه تبخیر روتاری[۹] در شرایط خلأ استفاده شد. پس از اطمینان از تبخیر کامل حلال، نمونه ها به ویال‌های شیشه‌ای منتقل و تا مدت ارسال برای تحلیل در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تمام مراحل برای نمونه شاهد تلقیح نشده نیز انجام شدند. برای بررسی تأثیر عوامل خارجی ازجمله دما یا اکسیداسیون بر میزان آفت کش طی زمان گرماگذاری و مقایسه نمونه شاهد تلقیح‌نشده با نمونه اولیه، نمونه تکنیکال آفت‌کش نیز با کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی بررسی شد.

بررسی میزان تجزیه با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS): در پژوهش حاضر از گازکروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی مدل Shimadzu-QP-2010SE مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ساکن درونی ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه حرارتی محفظه گرمایی از ۶۰ تا ۲۸۰ درجه سانتی گراد با شیب ۵ درجه سانتی گراد بر دقیقه تنظیم شد. دمای محل تزریق و لوله اتصال، ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. همچنین سرعت گاز حامل هلیوم برابر با ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، نسبت تقسیم ۱ به ۱۰ و میزان تزریق نمونه برابر ۱ میکرولیتر قرار داده شد. دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی گراد، مد یونیزاسیون EI و انرژی یونیزاسیون 70eV تنظیم شد. میزان درصد تخریب کلرپیریفوس استخراج شده با استونیتریل به وسیله اندازه‌گیری نسبت سطح زیر پیک مربوط به کلرپیریفوس به سطح زیر پیک مربوط به نرمال اکتان (ترکیب استاندارد داخلی) حاصل شد.

بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر رشد سویه منتخب در حضور آفت‌کش (تنها منبع کربن): از آنجا که رشد باکتری به استفاده از منبع کربن وابسته است، ایجاد شرایط رشدی بهتر برای سویه در حضور آفت‌کش کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) به تجزیه بهتر این آفت‌کش منجر می‌شود؛ به این منظور، اثر چهار فاکتور مهم دما، اسیدیته، نمک و میزان منبع کربن کلرپیریفوس بر رشد سویه منتخب بررسی شد. در همه مراحل از محیط کشت پایه معدنی M9 اصلاح‌شده مانند مراحل پیشین استفاده و در هر مرحله، تنها یک عامل بررسی شد. تلقیح باکتری در تمام مراحل با استفاده از کشت تازه باکتری و تهیه کدورتی مشابه با کدورت نیم مک

Archive of SID

www.SID.ir

فارلند و تلقیح به میزان ۳ درصد محیط از کدورت تهیه‌شده انجام شد و محیط‌ها در شیکرانکوباتور با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند (تمام مراحل سه بار تکرار شدند). پس از گذشت ۱۰ روز دوره گرماگذاری، میزان رشد از طریق کشت روی محیط جامد با روش قطره‌ای[10] (۲۱ و ۲۲) و شمارش تعداد کلنی‌ها پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد سنجیده شد. در روش قطره‌ای پس از گذشت زمان گرماگذاری، سریال رقت از همه نمونه ها تهیه و مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر رقت به محیط‌های کشت جامد اضافه و شمارش پس از ظهور کلنی ها انجام شد. در این روش، تعداد ۳ تا ۳۰ کلنی قابل شمارش در نظر گرفته شدند.

دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد برای بررسی دمای بهینه؛ اسیدیته‌های ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ برای بررسی اسیدیته بهینه؛ درصدهای نمک ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ برای بررسی درصد نمک بهینه و غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آفت‌کش برای بررسی غلظت آفت‌کش بهینه برای رشد بررسی شدند. هرکدام از مراحل جداگانه انجام و در هر یک، تنها فاکتور بررسی‌شده تغییر داده شد و سایر فاکتورها ثابت در نظر گرفته شدند.در نتیجه، دما به میزان ۳۴ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته به میزان ۷، نمک به اندازه ۵ درصد و غلظت کلرپیریفوس به میزان ۱۰۰میلی گرم در لیتر در نظر گرفته شد.

رسم منحنی رشد سویه منتخب در حضور کلرپیریفوس (تنها منبع کربن): برای رسم منحنی رشد سویه منتخب پس از یافتن فاکتورهای مؤثر بر رشد، محیط مایع پایه معدنی اصلاح‌شده در شرایط بهینه رشدی تهیه و مشابه مراحل پیش، تلقیح از کشت تازه انجام و ۱۴ روز گرماگذاری شد. برای سنجش رشد، هر روز از محیط سریال رقت تهیه و شمارش کلنی به روش قطره‌ای روی محیط جامد MH (moderate halophilic medium) ۵ درصد انجام شد. ترکیب محیط کشت MH ۵ درصد عبارت بود از: ۴۰/۵ گرم NaCl، ۳/۵ گرم $MgCl_2.6H_2O$، ۰/۱۸ گرم $CaCl_2$، ۴/۸ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۱ گرم KCl، ۰/۰۱۳ گرم NaBr، ۵ گرم Proteose peptone، ۱۰ گرم Yeast extract و ۱۵ گرم Agar در لیتر.

نتایج

جداسازی و غنی‌سازی: ویژگی‌های اصلی نمونه‌های استفاده‌شده در پژوهش حاضر در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

پس از سه مرحله غنی‌سازی ۱۴ روزه، جمعیت میکروبی از هر نمونه جدا و حضور باکتری ها در هر مرحله غنی‌سازی با رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی پس از مرحله غنی سازی تأیید شد. در کل، ۲۸ جدایه از محیط‌های غنی‌سازی، خالص‌سازی شدند. از این بین، ۵ جدایه از نمونه خاک روستای کاغذی کاشان، ۶ جدایه از نمونه خاک ابوزیدآباد کاشان، ۵ جدایه از نمونه خاک ایوانکی، ۶ جدایه از نمونه آب مزرعه نیشکر و ۶ جدایه از پساب کارخانه تولیدکننده آفت کش جدا شدند و تعداد ۱۶ جدایه گرم مثبت و ۱۲ جدایه گرم منفی بودند.

غربال‌گری و بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه‌ها: از تعداد ۲۸ جدایه‌ای که در حضور ۵۰mg/l کلرپیریفوس کشت داده شدند، ۱۴ جدایه با توجه به کدورت محیط رشد، مشاهده میکروسکوپی و مشاهده کلنی روی محیط جامد

Archive of SID

www.SID.ir

برای مرحله بعد انتخاب شدند. در این مرحله با افزایش غلظت آفت‌کش به ۱۰۰mg/l، رشد با شمارش کلنی‌ها بررسی شد، که در این بررسی ۵ جدایه بیشترین میزان رشد را داشتند و از بین آن‌ها، جدایه CDB5 به علت رشد بیشتر به‌عنوان جدایه منتخب انتخاب شد. ویژگی‌های کلی و میزان رشد ۵ جدایه دارای بیشترین رشد در جدول ۲ نشان داده شده است.

شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنتیک سویه منتخب: نتایج بررسی حاضر نشان دادند که سویه منتخب به شاخه *Gammaproteobacteria* و جنس *Halomonas* متعلق است و ۹۸/۱ درصد با سویه *Halomonas kenyensis* AIR-2 شباهت و بیشترین قرابت را دارد (جدول ۳). درخت فیلوژنتیکی رسم‌شده با توالی ژن *16S rRNA* حاصل از سویه منتخب به روش Neighborjoining و ضریب Bootstrap 1000 و با نرم‌افزار Mega6 در شکل ۱ دیده می‌شود.

جدول ۱- ویژگی نمونه‌های استفاده‌شده برای جداسازی

نمونه	هدایت الکتریکی[11] (میکروزیمنس/سانتی‌متر)[12]	میزان نمک‌های محلول[13] (میلی گرم/لیتر)	شوری[14] (گرم/لیتر)	اسیدیته
خاک کشاورزی ایوانکی	۲۳۴۰۰	۱۱۷۹۰	۱۱/۸	۷/۶
آب مزرعه نیشکر	۲۴۵۰۰	۱۲۰۳۰	۱۴/۶۶	۷/۳۶
خاک کشاورزی روستای کاغذی کاشان	۱۴۳۰۰	۷۲۲۰	۶/۸	۷/۲۲
خاک کشاورزی ابوزیدآباد کاشان	۱۳۸۵۰	۵۹۵۰	۶/۵	۷/۲
پساب کارخانه تولید آفت‌کش گیاه	۴۴۴	۲۲۲	۰/۰۱۴	۶/۹۱

جدول ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه‌های تجزیه‌کننده کلرپیریفوس

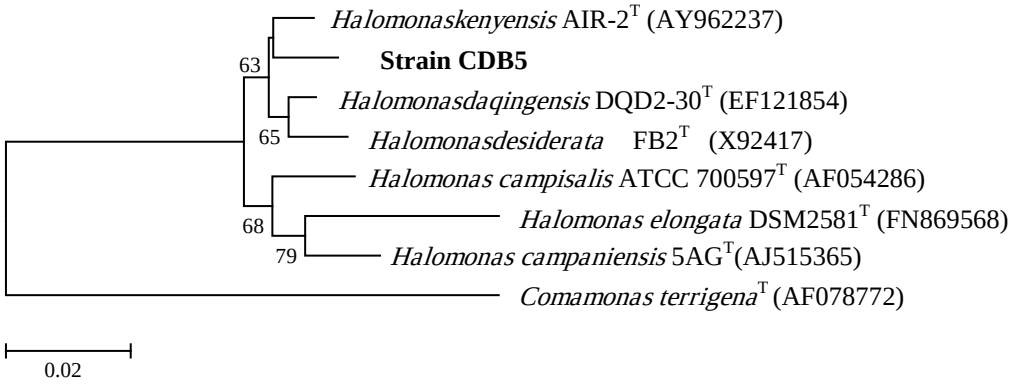
جدایه	محل جداسازی	شکل میکروسکوپی	واکنش به رنگ‌آمیزی گرم	آزمون KOH ۳ درصد	آزمون کاتالاز	آزمون اکسیداز	محدوده تحمل نمک (درصد)	تعداد کلنی‌ها (CFU[15]/ml)
CDB1	آب مزرعه نیشکر	میله‌ای	منفی	+	+	–	۱-۱۵	$۱/۹\times۱۰^{۵}$
CDB2	آب مزرعه نیشکر	میله‌ای	منفی	+	–	+	۱-۱۵	۴×۱۰^{۴}
CDB3	آب مزرعه نیشکر	میله‌ای	منفی	+	+	+	۱-۱۵	$۳/۲\times۱۰^{۴}$
CDB4	آب مزرعه نیشکر	میله‌ای	منفی	+	+	+	۱-۱۲/۵	$۶/۳\times۱۰^{۵}$
CDB5	خاک کشاورزی ایوانکی	میله‌ای	منفی	+	+	+	۱-۲۰	$۳/۸\times۱۰^{۶}$

جدول ۳- میزان شباهت سویه منتخب با سه سویه نزدیک در پایگاه Eztaxon

سویه	سویه‌های نزدیک	شماره دسترسی در Genbank	میزان شباهت (درصد)
CDB5	*Halomonas kenyensis* AIR-2 (T)	AY962237	۹۸/۱
	Halomonas daqingensis DQD2-30 (T)	EF121854	۹۷/۹
	Halomonas desiderata FB2 (T)	X92417	۹۷/۴

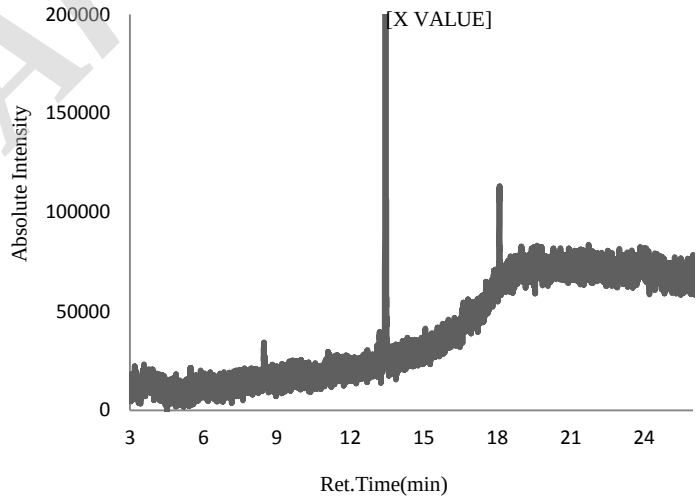
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک سویه منتخب که با روش Neighbour-joining رسم و در آن، *Comamonas terrigena* (AF078772) به‌عنوان outgroup در نظر گرفته شده است. اعداد در بخش انشعاب، بوت استرپ از ۱۰۰۰ نمونه را نشان می‌دهند و مقادیر بوت استرپ کمتر از ۵۰ نشان داده نشده‌اند.

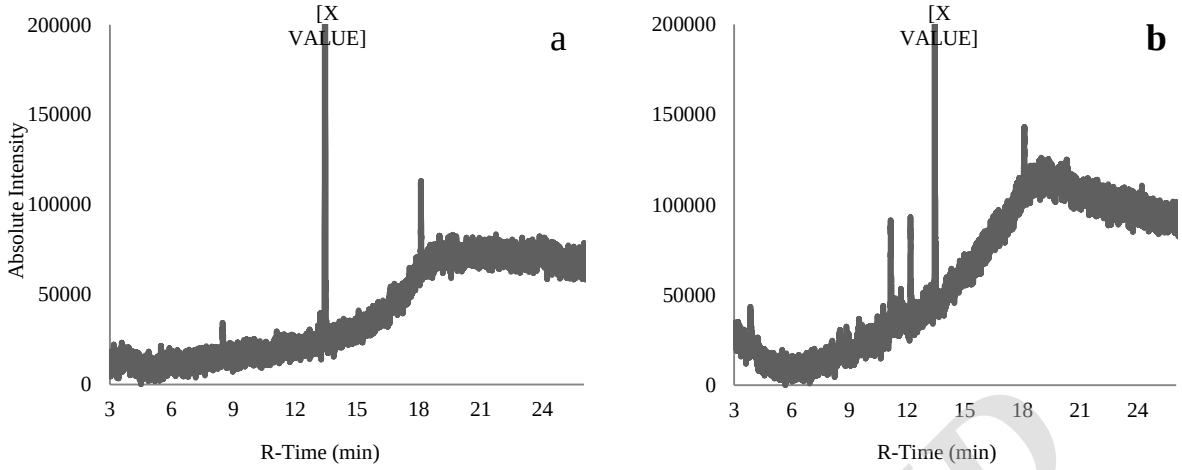
بررسی میزان تجزیه آفت کش توسط سویه منتخب: نتایج تحلیل کروماتوگرافی نشان دادند که سویه منتخب در محیط پایه معدنی و بدون هرگونه محرک رشد، کلرپیریفوس را به میزان ۲۵/۲۳ درصد تجزیه می‌کند. شکل ۲، کروماتوگرام نمونه تکنیکال، شکل ۳، a و b به‌ترتیب کروماتوگرام نمونه شاهد تلقیح‌نشده و کروماتوگرام نمونه تلقیح‌شده با سویه CDB5 را نشان می‌دهند. نتیجه تحلیل درصد سطح زیر منحنی حاصل برای کلرپیریفوس در نمونه‌های تکنیکال، شاهد تلقیح‌شده و نمونه تلقیح‌شده با سویه CDB5 درجدول ۴ آورده شده است.



شکل ۲- کروماتوگرام GC-MS نمونه تکنیکال کلرپیریفوس

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- a. کروماتوگرام GC-MS نمونه شاهد تلقیح‌نشده، b. کروماتوگرام GC-MS نمونه تلقیح‌شده با سویه CDB5 پس از ۱۰ روز گرماگذاری در دمای ۳۴ و حضور ۱۰۰ mg/l کلرپیریفوس

جدول ۴- نتیجه تحلیل GC-MS نمونه تکنیکال، نمونه شاهد تلقیح‌نشده و نمونه تلقیح‌شده با سویه CDB5

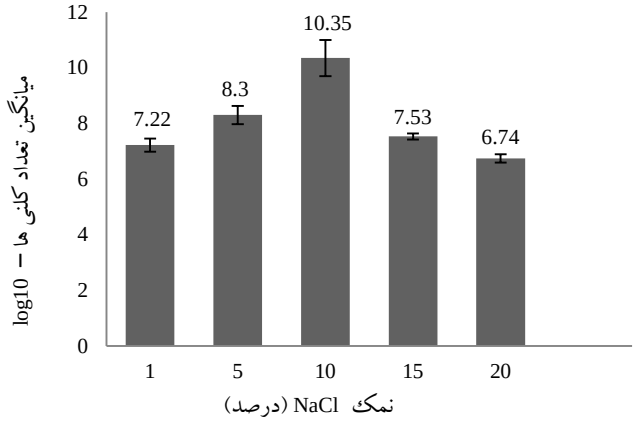
Area %	R-Time(min)	Sample	Name
۸۸/۹۷	۱۳/۴۶	تکنیکال	O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)- phosphorothioate (CP))
۸۶/۲۱	۱۳/۴۶	شاهد تلقیح‌نشده	
۶۰/۹۸	۱۳/۴۲	CDB5	

بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر رشد سویه منتخب در حضور آفت‌کش (تنها منبع کربن): بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر میزان رشد نشان داد که سویه منتخب در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، نمک ۱۰ درصد، اسیدیته ۷ و غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر کلرپیریفوس و در حضور آفت کش (تنها منبع کربن) بهترین رشد را دارد (شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷).

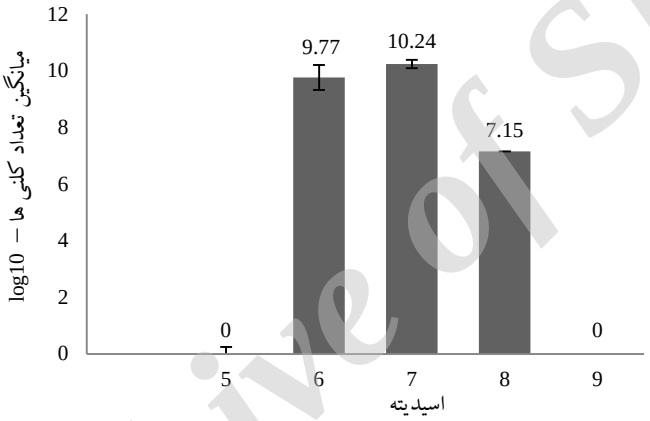
شکل ۴- بررسی اثر دما بر رشد سویه منتخب در حضور آفت‌کش کلرپیریفوس (تنها منبع کربن)

Archive of SID

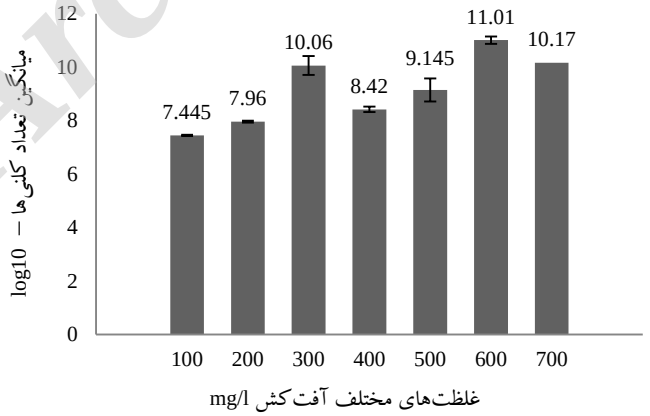
www.SID.ir



شکل ۵- بررسی اثر درصدهای مختلف نمک بر رشد سویه منتخب در حضور آفت‌کش کلرپیریفوس (تنها منبع کربن)



شکل ۶- بررسی اثر میزان‌های مختلف اسیدیته بر رشد سویه منتخب در حضور آفت‌کش کلرپیریفوس (تنها منبع کربن)

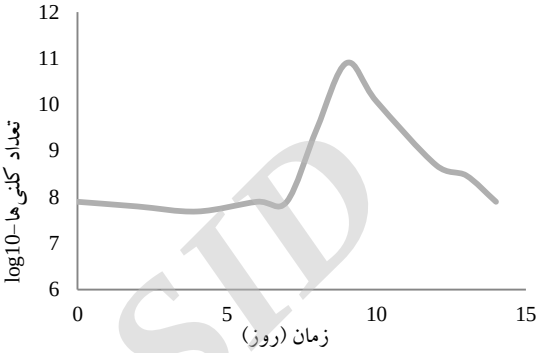


شکل ۷- بررسی میزان رشد سویه منتخب در حضور غلظت‌های مختلف آفت‌کش کلرپیریفوس (تنها منبع کربن)

Archive of SID

www.SID.ir

رسم منحنی رشد سویه منتخب در حضور کلرپیریفوس (تنها منبع کربن): منحنی رشد سویه منتخب در محیط پایه معدنی با اسیدیته ۷، دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، نمک ۱۰ درصد و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) طی ۱۴ روز رسم شد (شکل ۸).



شکل ۸- منحنی رشد سویه منتخب در حضور آفت‌کش (تنها منبع کربن)

بحث و نتیجه‌گیری

آفت کش ها برای تولید در کشاورزی ضروری هستند. افزایش استفاده از آفت‌کش‌ها به میزان زیادی به تولید و کاهش خسارت‌ها در ذخیره‌سازی محصولات کمک می‌کند و باعث بهبود رفاه انسان‌ها می‌شود، هرچند استفاده از این مواد به ایجاد باقیمانده‌های نامطلوب به‌شکل ریز آلاینده‌ها[16] روی موادغذایی، محیط‌زیست و بافت‌های زنده منجر می‌شود. این مواد از منطقه تیمارشده به مناطق دورتر در محیط حرکت می‌کنند و به موجودات غیرهدف می‌رسند (۲۳).

بیشترین آفت کش هایی که در سراسر دنیا استفاده می‌شوند، آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته هستند. اگرچه این آفت‌کش‌ها نقش مهمی در محافظت از محصولات کشاورزی در برابر آفت‌ها و علف‌های هرز و نیز کنترل ناقلان بیماری‌ها دارند، عامل مشکل آلودگی جدی زیست‌محیطی هستند (۲۴).

ریزموجودات نمک‌دوست و یا تحمل کننده نمک به علت ویژگی های فیزیولوژیک و تحمل بیشتر نسبت به فشارهای اسمزی زیاد، گزینه مناسبی برای پاکسازی خاک و یا آب‌های کشاورزی دارای شوری زیاد و املاح فراوان هستند. در سال‌های اخیر، توجه به موضوع تجزیه زیستی با نمک‌دوست‌ها در حال افزایش است و انواع مختلف تجزیه کننده‌های یوکاریوت و پروکاریوت نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک جداسازی و ویژگی‌های آنها بررسی شده است (۲۵- ۲۸).

پژوهش‌های اندکی در زمینه پاکسازی آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته توسط میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست انجام شده است: دیفرانک[17] و چنگ[18]، سویه باکتریایی نمک‌دوست معتدل با عنوان JD6.5 را از دریاچه نمک گرانتسویل[19] در غرب ایالت یوتا جداسازی کردند و توانایی فعالیت آنزیماتیک زیاد این سویه در برابر تعداد زیادی ترکیب ارگانوفسفاته بسیار سمی را نشان دادند. در سال ۱۹۹۳ دیفرانک و همکاران، سویه JD6.5 را متعلق به جنس *Alteromonas* معرفی و سایرگونه‌های این جنس را برای وجود آنزیم هیدرولیزکننده ارگانوفسفاته بررسی کردند و تشابه عملکرد آنزیمی را بین گونه‌های نزدیک نشان دادند (۲۹ و ۳۰).

هایس[20] و همکاران (۲۰۰۰)، متابولیسم ارگانوفسفونات[21]، کلاسی از ترکیبات ارگانوفسفاته را توسط سویه نمک‌دوست معتدل *Chromohalobacter marismortui* عضو خانواده *Halomonadaceae* نشان دادند (۳۱).

آنسسو[22] و همکاران (۲۰۰۷)، سویه باکتریایی نمک‌دوستی را از دریاچه نمک در رومانی جداسازی و رشد آن را در حضور آفت‌کش ارگانوفسفاته

Archive of SID

www.SID.ir

دیکلروووس[۲۳] (DDVP) بررسی کردند. آنها نشان دادند که این سویه با مکانیسم استفاده از «اسمولایت آلی[۲۴]»، آفت‌کش را به درون سیتوپلاسم سلول جذب می‌کند و باعث حذف آن در محیط نمکی می‌شود (۳۲).

پراوین[۲۵] و همکاران (۲۰۱۲)، تجزیه آفت‌کش اندوسولفان از گروه ارگانوکلرین‌ها و متیل‌پاراتیون از گروه ارگانوفسفاته‌ها را توسط سویه باکتریایی از شاخه اکتینومیست‌ها و جداشده از دریا به نام *Nocardiopsis* sp. نشان دادند (۳۳).

در سال ۲۰۱۳، ناوینا[۲۶] و همکاران سویه ACT 1 *Streptomyces venezuelae* تحمل‌کننده نمک جداشده از آب دریا را برای تجزیه آفت‌کش ارگانوفسفاته پاراتیون انتخاب و فعالیت ارگانوفسفروس هیدرولازی آن را بررسی کردند (۳۴).

نتایج نشان دادند که سویه نمک‌دوست منتخب با ۹۸/۱ درصد شباهت، بیشترین نزدیکی را به *Halomonas kenyensis* دارد و به جنس *Halomonas*، خانواده *Halomonadaceae* و رده *Gamaproteobacteria* متعلق است. خانواده *Halomonadaceae* بیشتر شامل ریزموجودات دریایی و نمک‌دوست معتدل است که از لحاظ فنوتیپی بسیار گسترده هستند. جنس‌های *Halomonas* و *Chromohalobacter* به‌عنوان الگوهای نمک‌دوست مطالعه شده‌اند. گونه‌های خانواده *Halomonadaceae* برای بسیاری از اهداف زیست‌فناوری استفاده می‌شوند. تاکنون کاربردهای بسیار متفاوتی پیشنهاد شده‌اند و برخی کاربردهای اعضای این خانواده عبارتند از: تولید محلول های سازگاری[۲۷]، ترکیبات خارج سلولی ازجمله اگزوپلی‌ساکاریدها و آنزیم‌ها و استفاده از آنها در فرایندهای پاکسازی زیستی. این باکتری‌ها و سایر باکتری‌های نمک‌دوست معتدل برای تجزیه ترکیبات سمی در غلظت‌های زیاد و متوسط نمک به کار می‌روند و استفاده دوباره از مواد باقیمانده صنعتی شور و محیط‌های شور آلوده را امکان‌پذیر می‌کنند، هرچند مطالعات اندکی در این زمینه انجام شده است (۳۵).

مطالعه‌های اندکی درباره توانایی اعضای جنس *Halomonas* و خانواده *Halomonadaceae* در پاکسازی زیستی آفت کش‌ها وجود دارند. درسال ۱۹۹۶ مالتسیوا[۲۸] و همکاران، هالوموناس هایی با قابلیت استفاده از ترکیبات کلروآروماتیک به عنوان تنها منبع کربن و انرژی را جداسازی و تجزیه علف‌کش ۲ و ۴-دی کلروفنوکسی‌استیک‌اسید (2,4-D) را به‌طورجزئی مطالعه کردند (۳۶).

همچنین کلینستوبر[۲۹] و همکاران (۲۰۰۱)، استفاده از سویه قلیادوست و نمک‌دوست معتدل *Halomonas* sp. strain EF43 را برای بیان مسیر تجزیه‌ای 2,4-D با استفاده از پلاسمید pJP4 گزارش کردند (۳۷).

آفت‌کش بررسی‌شده در پژوهش حاضر از گروه ترکیبات ارگانوفسفاته است و بررسی مطالعه‌ها درباره تجزیه زیستی ترکیبات ارگانوفسفاته توسط خانواده *Halomonadaceae* نشان داد، تنها مطالعه هایس و همکاران که پیش‌تر به آن اشاره شد (۳۱)، متابولیسم ارگانوفسفونات را بررسی کرده است. درباره تجزیه زیستی ترکیبات ارگانوفسفاته توسط جنس *Halomonas* و تجزیه زیستی آفت‌کش کلرپیریفوس توسط نمک‌دوست‌ها گزارشی یافت نشده است.

کروماتوگرام کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی حاصل از تحلیل باقیمانده آفت‌کش‌ها نشان داد که سویه منتخب در پژوهش حاضر دارای قابلیت حذف ۲۵/۲۳ درصد آلاینده در محیط پایه معدنی حاوی ۱۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌گرم در لیتر کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) است. با توجه به اینکه شرایط رشدی برای سویه، شرایط تنشی بدون هرگونه منبع کربن بجز آفت‌کش و میزان آن نیز در محیط بسیار کم بوده است، رشد کم سویه و در نتیجه درصد کم تجزیه در این سویه توجیه‌پذیر است و از این رو با بهترکردن شرایط رشد، شرایط تجزیه‌ای نیز بهتر می‌شود. مقایسه کروماتوگرام نمونه تکنیکال با نمونه شاهد تلقیح‌نشده نیز حاکی از آن است که طی گرماگذاری، غلظت آفت‌کش به میزان زیادی پایدار است.

بررسی فاکتور دما نشان داد که سویه منتخب در حضور آفت‌کش و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، بهترین رشد را دارد. بررسی مطالعه‌های پیشین نشان می‌دهد که بیشتر سویه‌های باکتریایی جداشده در دماهای ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بهترین تجزیه را نشان می‌دهند و سویه‌های مزوفیل، تجزیه‌کننده‌های بهتری هستند. تاکنون گزارشی درباره سویه‌های میکروبی گرمادوست و سرمادوست برای تجزیه کلرپیریفوس انجام نشده است (۱۱).

بررسی مطالعه‌های موجود درباره تجزیه زیستی آفت‌کش‌ها توسط نمک‌دوست‌ها نشان می‌دهد که سویه‌های معرفی‌شده در گروه نمک‌دوست‌های معتدل قرار می‌گیرند (۱۱). بررسی رشد سویه منتخب در حضور غلظت‌های مختلف نمک، رشد سویه منتخب را در غلظت‌های ۱ تا ۲۰ درصد نمک نشان داد که توانایی این سویه برای رشد در محیط‌های دارای درصد کم و نیز درصد زیاد نمک و امکان استفاده از آن در پاکسازی محیط‌هایی با درصدهای متغیر نمک را نشان می‌دهد. سویه منتخب، بهترین رشد را در حضور آفت‌کش و ۱۰ درصد نمک داشت و در نتیجه این درصد نمک، بهترین میزان برای رشد و تجزیه آفت‌کش توسط سویه در نظرگرفته شود. مانند مطالعه‌های پیشین، این سویه در گروه نمک‌دوست‌های معتدل قرار می‌گیرد.

مطالعه‌های گذشته نشان می‌دهند که باکتری‌ها در گستره اسیدیته ۵/۵ تا ۸/۵ کلرپیریفوس را تجزیه می‌کنند (۱۱). بررسی رشد سویه در اسیدیته‌های مختلف نشان داد که سویه منتخب در اسیدیته ۷ بهترین رشد را در حضور آفت‌کش دارد. این اسیدیته مشابه شرایط جداسازی سویه و مشابه اسیدیته محل جداسازی نمونه است.

بررسی رشد سویه منتخب در غلظت های مختلف آفت‌کش نشان داد که رشد با افزایش میزان آفت‌کش تا ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش می‌یابد و این غلظت، بهترین غلظت برای تجزیه در نظر گرفته می‌شود.

منابع نشان می‌دهند هرچه غلظت آفت‌کش در محیط افزایش یابد، میزان سمیت و پایداری آن بیشتر می‌شود (۱۲). مطالعه‌های پیشین در زمینه تجزیه آفت‌کش کلرپیریفوس نشان می‌دهند که سویه‌های باکتریایی قادر به تجزیه کلرپیریفوس از ۱۵ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر هستند و محدوده گسترده‌ای درباره تحمل‌پذیری گزارش شده است. همچنین گفته شده است که میزان تجزیه با افزایش غلظت کلرپیریفوس کاهش می‌یابد (۱۱).

در پژوهش حاضر مشخص شد سویه منتخب در غلظت زیاد کلرپیریفوس و نبود منبع کربنی بجز آفت‌کش، رشد خوبی دارد که نشان‌دهنده تجزیه ترکیب یادشده در غلظت‌های زیاد است.

با توجه به اینکه رشد سویه به‌طور غیرمستقیم نمایان‌کننده تجزیه ترکیب آلاینده است، سویه منتخب در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷، نمک ۱۰ درصد و غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرپیریفوس،

Archive of SID

www.SID.ir

رشد و در نتیجه تجزیه بیشتری دارد و نیازمند بررسی‌ای دقیق GC-MS برای تعیین میزان تجزیه است.

بررسی رشد سویه منتخب با رسم منحنی رشد نشان می‌دهد که این سویه تا روز نهم، رشد کمی داشته و پس از آن، رشد افزایش می یابد. رشد کم در روزهای اولیه به علت ایجاد متابولیت‌ها هنگام شکستن آفت‌کش ازجمله متابولیت TCP است که مهم‌ترین و اصلی‌ترین متابولیت حاصل از شکست کلرپیریفوس و ماده‌ای سخت و مقاوم در برابر تجزیه زیستی و غیرزیستی است (۱۵). افزایش رشد بعدی به علت سازگاری به حضور متابولیت‌ها و شکستن آنهاست.

در مجموع، با توجه به مشکلات یادشده درباره استفاده مکرر و فراوان آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته و خطرهای زیست‌محیطی ناشی از آنها، وجود مشکل شوری در بخش کشاورزی به‌ویژه زه‌آب‌ها، وجود مشکل کم‌آبی و در نتیجه استفاده مکرر از زه‌آب‌ها برای تکمیل منابع آب، استفاده از روشی سازگار با محیط‌زیست برای پاکسازی آلاینده‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. در پژوهش حاضر مشخص شد که باکتری‌های نمک‌دوست به علت سازگاری با محیط‌های شور راهکاری برای تجزیه زیستی آفت‌کش‌های ارگانوفسفاته هستند.

تشکر و قدردانی

از زحمات آقای مهندس مهدی مشتاقی نیکو از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک میکروارگانیسم‌ها و آقای مهندس فرنود فرزام از پژوهشگاه صنعت نفت سپاسگزاری می‌شود که ما را در انجام پژوهش حاضر یاری کردند.

References

(1) Niter C., Sunita S., Kamlesh K., Rakesh K. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Research Journal of Chemistry and Environment* 2013; 17(4): 88-105.

(2) Singh BK., Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS microbiology reviews* 2006; 30(3): 428-471.

(3) Das S. *Microbial biodegradation and bioremediation*. 1th ed. Amsterdam: Elsevier Science; 2014

(4) Nawaz K., Hussain K., Choudary N., Majeed A., Ilyas U., Ghani A., et al. Eco-friendly role of biodegradation against agricultural pesticides hazards. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5(3): 177-183.

(5) Arias-Estévez M., López-Periago E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto JC., García-Río L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 2008; 123(4): 247-260.

(6) Singh BK. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology* 2009; 7: 156-164.

(7) George N., Chauhan PS., Sondhi S., Saini S., Puri N., Gupta N. Biodegradation and analytical methods for detection of organophosphorous pesticide: Chlorpyrifos. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology* 2014; 20(2): 79-94.

(8) Kulshrestha G., Kumari A. Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremoniu*m sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil. *Biology and fertility of soils* 2011; 47: 219-225.

Archive of SID

www.SID.ir

(9) Chishti Z., Hussain S., Arshad KR., Khalid A., Arshad M. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. *Journal of environmental management* 2013; 114: 372-380.

(10) Bhagobaty RK., Joshi SR., Malik A. Microbial degradation of organophosphorous pesticide: Chlorpyrifos (mini review). *Internet Journal of Microbiology* 2007; 4(1): 1-13.

(11) Yadav M., Shukla AK., Srivastva N., Upadhyay SN., Dubey SK. Utilization of microbial community potential for removal of chlorpyrifos: A review. *Critical reviews in biotechnology* 2015: 1-16.

(12) John EM., Shaike JM. Chlorpyrifos: pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters* 2015; 13(3): 269-291.

(13) Gavrilescu M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences* 2005; 5(6): 497-526.

(14) Vidali M. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 2001; 73(7): 1163-1172.

(15) Karpouzas DG., Singh BK. Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis. *Advances in microbial physiology* 2006; 51: 119-225.

(16) Rahimian MH., Poormohammadi S., Hasheminejhad Y., Meshkat MA. Impact of climate change on salinization in Iran. *Iranian journal of soil research* 2013; 27(1): 1-11.

(17) Gerhardt P., Murray R., Wood WA., Krieg NR. *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1994.

(18) Subow NN. *Oceanographical tables.* Moscow: Commissariat of agriculture of USSR; 1931.

(19) Ludwig W., Strunk O., Klugbauer S., Klugbauer N., Weizenegger M., Neumaier J., et al. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis (review). *Electrophoresis* 1998; 19(4): 554-568.

(20) Lakshmi CV., Kumar M., Khanna S. Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2008; 62(2): 204-209.

(21) Naghili H., Tajik H., Mardani K., Rouhani SMR., Ehsani A., Zare P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum* 2013; 4(3): 179-183.

(22) Chen CY., Nace GW., Irwin PL. A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes,* and *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods* 2003; 55(2): 475-479.

(23) Tiryaki O., Temur C. The fate of pesticide in the environment. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 2010; 4(10): 29-38.

(24) Zheng Y., Long L., Fan Y., Gan J., Fang J., Jin W. A review on the detoxification of organophosphorus compounds by microorganisms. *African Journal of Microbiology Research* 2013; 7(20): 2127-2134.

(25) Dastgheib SM., Amoozegar MA., Khajeh K., Ventosa A. A halotolerant *Alcanivorax* sp. strain with potential application in saline soil remediation. *Applied microbiology and biotechnology* 2011; 90(1): 305-312.

(26) Rezaei somee, M., Amoozegar, M., Shavandi, M., Dastgheib, S. Isolation of halophilic microbial consortia capable of degrading diesel oil for the bioremediation of drilling wastes. *Biological Journal of Microorganism*, 2016; 5(19): 23-40.

(27) Makzum, S., Amoozegar, M., Dastgheib, S. Isolation and identification of obligately chemolithoautotrophic, haloalkaliphilic bacterium Thioalkalivibrio sp. strain EMA and optimizing its thiosulfate removal activity in haloalkaliphilic condition. *Biological Journal of Microorganism*, 2017; 6(21): 15-29.

Archive of SID

www.SID.ir

(28) Selseleh Hassan-Kiadehi, M., Amoozegar, M., Asad, S. Evaluation of biodecolorization of the textile azo dye by halophilic archaea. *Biological Journal of Microorganism*, 2017; 6(23): 1-17.

(29) DeFrank JJ., Beaudry WT., Cheng TC., Harvey SP., Stroup AN., Szafraniec LL. Screening of halophilic bacteria and Alteromonas species for organophosphorus hydrolyzing enzyme activity. *Chemico-biological interactions* 1993; 87(1-3): 141-148.

(30) DeFrank JJ., Cheng TC. Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacterial isolate. *Journal of bacteriology* 1991; 173(6): 1938-1943.

(31) Hayes VE., Ternan NG., McMullan G. Organophosphonate metabolism by a moderately halophilic bacterial isolate. *FEMS microbiology letters* 2000; 186(2): 171-175.

(32) Oncescu T., Oancea P., Enache M., Popescu G., Dumitru L., Kamekura M. Halophilic bacteria are able to decontaminate dichlorvos, a pesticide, from saline environments. *Central European Journal of Biology* 2007; 2(4): 563-573.

(33) Pravin D., Sandip B., Shreyash B., Anjana G. Degradation of organophosphate and organochlorine pesticides in liquid culture by marine isolate nocardiopsis species and its bioprospectives. *Journal of Environmental Research and Development* 2012; 7(2A): 995-1001.

(34) Naveena B., Annalakshmi G., Partha N. An efficacious degradation of pesticide by salt tolerant Streptomyces venezuelae ACT 1. *Bioresource technology* 2013; 132: 378-382.

(35) Arahal DR., Ventosa A. The family Halomonadaceae. In: Dworkin M., editor in chief. Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E., editors. *The prokaryotes*. 3th ed. NewYork: Springer; 2006: 811-835.

(36) Maltseva O., McGowan C., Fulthorpe R., Oriel P. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria. *Microbiology* 1996; 142: 1115-1122.

(37) Kleinsteuber S., Müller RH., Babel W. Expression of the 2,4-D degradative pathway of pJP4 in an alkaliphilic, moderately halophilic soda lake isolate, Halomonas sp. EF43. *Extremophiles* 2001; 5(6): 375-384.

---

[1]- Xenobiotic
[2]- Bioremediation
[3]- fennig and Lippert Microelement Solution
[4]- http://gyahcorp.ir
[5]- Marmur
[6]- Liquid-Liquid extraction
[7]- Lakshmi
[8]- Separatory funnel
[9]- Rotary evaporator
[10]- Drop plate method
[11]- Conductivity
[12]- μS/cm
[13]- Total dissolved salt (TDS)
[14]- Salinity
[15]- Colony Forming Unit
[16]- trace contaminants
[17]- DeFrank
[18]- Cheng
[19]- Grantsville
[20]- Hayes
[21]- Organophosphonate
[22]- Oncescu
[23]- Dichlorvos
[24]- Organic-osmolyte
[25]- ravin
[26]- Naveena
[27]- Compatible solute
[28]- Maltseva
[29]- Kleinsteuber

Archive of SID

www.SID.ir