



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی



## تجزیه زیستی مالاتیون توسط کشت میکس سویه های *Pseudomonas aeruginosa* BNA2 و *Serratia marcescens* BNA1

بنفشه نادعلیان<sup>۱</sup>، محسن شهریاری مقدم<sup>۲\*</sup>، غلامحسین ابراهیمی پور<sup>۳</sup>، بهاره نادعلیان<sup>۱</sup>

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۲- (نویسنده مسئول): دکترای زیست شناسی دریا، استادیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
- ۳- دکترای میکروبیولوژی، دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:	چکیده
تاریخ دریافت: ۹۴/۰۷/۲۵	<b>زمینه و هدف:</b> حشره کش‌های ارگانوفسفره استفاده‌های گسترده خانگی و صنعتی داشته و منجر به ایجاد اثرات سمی در سیستم‌های زیستی می‌شوند. زیست پالایی یکی از مهمترین روش‌های تصفیه این ترکیبات در محیط زیست است. این روش به دلیل هزینه‌ها و آثار زیست محیطی کمتر، جایگزین مناسبی برای روش‌های فیزیکی- شیمیایی است.
تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۱	<b>روش بررسی:</b> توان تجزیه زیستی مالاتیون توسط سویه‌های <i>Serratia marcescens</i> BNA1 و <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BNA2 جداسازی شده از منطقه اروند کنار بررسی و مطالعه شد. به منظور بررسی توان تجزیه زیستی مالاتیون، سویه BNA1 بر روی محیط کشت پایه معدنی به همراه مالاتیون خالص کشت داده شد. همچنین توان تجزیه زیستی مالاتیون خالص توسط کشت خالص و میکس سویه‌های BNA1 و BNA2 به همراه و بدون سورفکتانت ( <i>Tween 80</i> )، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی سنجش گردید.
واژگان کلیدی: مالاتیون، تجزیه زیستی، Pseu- <i>Serratia marcescens</i> , <i>domonas aeruginosa</i>	<b>یافته‌ها:</b> نتایج نشان داد سویه‌های استفاده شده قادر به تجزیه زیستی مالاتیون خالص هستند. ارتباط معنی‌داری بین میزان تجزیه مالاتیون در تیمارهای مختلف مشاهده گردید. میزان تجزیه زیستی مالاتیون در تیمارهای $BNA1+Ma$ (۳۳/۸۸)، $BNA2+Ma$ (۲۶/۴۵)، $BNA1+BNA2+Ma$ (۴۶/۹۶)، $BNA1+Ma+Tween80$ (۶۱/۰۵)، $BNA2+Ma+Tween80$ (۴۰/۱۷)، $BNA1+BNA2+Ma+ Tween80$ (۶۷/۷۹) درصد بدست آمد.
پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mohsen.shahariari@uoz.ac.ir	<b>نتیجه‌گیری:</b> استفاده از کشت میکس به همراه سورفکتانت منجر به بالاترین کارایی تجزیه زیستی مالاتیون می‌شود. نتایج این مطالعه پس از انجام مطالعات پایلوت می‌تواند برای زیست پالایی مناطق آلوده به سموم ارگانوفسفره استفاده گردد.

## مقدمه

استفاده وسیع از منابع طبیعی و تولید بالای ترکیبات زئوبیوتیک از قبیل آفت کش‌ها موجب مشکلات زیست محیطی مختلفی از قبیل آلودگی هوا، آب و خاک شده است. امروزه بیشترین آفت کش‌های مورد استفاده متعلق به گروه ارگانوفسفره است. این آفت کش‌ها به صورت گسترده برای کنترل آفات کشاورزی و خانگی استفاده می‌شوند. مقدار کل مصرف سموم ارگانوفسفره بالغ بر ۳۸ درصد میزان آفت کش‌های استفاده شده است. استفاده وسیع از این سموم سالیانه در حدود ۳ میلیون مسمومیت و ۲۰۰۰۰۰ مرگ و میر ایجاد می‌کنند (۱). بافت هدف سموم ارگانوفسفره در جانوران سیستم عصبی است. این سموم آنزیم استیل کولین استراز را غیرفعال می‌کنند. نتیجه مهار این آنزیم تجمع استیل کولین آزاد در بافت عصبی و طولانی شدن پتانسیل عمل و در نهایت ایجاد اسپاسم، تشنج، فلج و در نهایت مرگ است (۲). در مورد اثرات این سموم بر بافت‌های غیر هدف و همچنین اثرات بلند مدت (مزمن) این ترکیبات مطالعات کمی انجام شده است. از اثرات جانبی این مواد می‌توان به واکنش‌های اکسیداتیو، خواص ایمنوتوکسیک، مختل کردن سیستم‌های متابولیکی، ژنوتوکسیک و سمیت بر کبد اشاره کرد (۳). اغلب مردم به دلیل آلودگی محیط و یا استفاده از محصولات کشاورزی آلوده به آفت کش‌ها به صورت مستمر در معرض این ترکیبات هستند (۴) و مطالعات بلند مدت می‌تواند نشان‌دهنده ارتباط بین این مواد و سرطان است (۵). تخمین زده می‌شود مصرف سالیانه آفت کش‌ها بالغ بر ۴ ton میلیون است در حالی که تنها یک درصد از این میزان به آفات هدف می‌رسد (۶). به علت استفاده وسیع از این سموم، آلودگی‌های آب و خاک ناشی از آن‌ها در مناطق مختلف گزارش شده است (۱) لذا تصفیه این مواد در محیط اهمیت زیادی دارد. این ترکیبات به روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی قابل حذف هستند. از روش‌های فیزیکی- شیمیایی که برای تصفیه این مواد استفاده شده است

می‌توان به استفاده از فتوکاتالیست‌های نیمه هادی مانند  $TiO_2$  (از مشکلات آن میزان بالای انرژی مصرفی توسط این روش است) (۷)، استفاده از نانو فیلترها (این روش در پالایش فاضلاب‌های صنعتی که دارای غلظت بالای آفت کش هستند، استفاده نشده است) (۸) و همچنین استفاده از روش‌های اکسیداسیون پیشرفته مانند تابش پرتوهای گاما و همچنین الکترون‌های پرشتاب (امکان ایجاد ترکیبات جانبی با سمیت بیشتر وجود دارد) (۹) اشاره کرد. استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای رفع این آلودگی‌ها نه تنها اقتصادی نیست، بلکه راه حل کامل و جامعی برای حل مشکل نیز نیستند، چراکه ترکیبات را به طور کامل از محیط حذف نمی‌کنند. بنابراین درمان زیستی روشی ارزان، معمول، کارآمد و دوستار محیط زیست است (۱۰) امروزه میکروارگانیسم‌ها به دلیل پتانسیل کاربردی‌شان در پاکسازی آلودگی‌های محیطی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. نقش میکروارگانیسم‌ها در تجزیه سموم مختلف به خوبی اثبات شده است. باکتری‌های مختلفی با توانایی تجزیه زیستی حشره‌کش‌های ارگانوفسفره و دیگر آفت کش‌ها جداسازی شده‌اند که از آنها می‌توان به *Lysinibacillus sp.* (۱۱)، *Sphingomonas sp.* (۱۲)، *Agrobacterium radiobacter* (۱۳) اشاره کرد. از مطالعات انجام گرفته در زمینه تاثیر عوامل محیطی در تجزیه زیستی مالاتیون می‌توان به مطالعات انجام شده توسط *Okamoto* و *Shibamoto* (۱۴) اشاره کرد. هم چنین *Shan* و همکاران نیز (۱۵) تاثیر اضافه کردن ترکیبات مختلف بر میزان توان تجزیه زیستی سویه *Acinetobacter johnsonii* MA19 را مطالعه کردند. مالاتیون یکی از حشره‌کش‌های ارگانوفسفره است که برای کنترل حشرات کشاورزی و خانگی به طور گسترده استفاده می‌شود. این حشره‌کش همچنین با نام‌های *Maldison*، *Carbophos* و *Mercaptothion* شناخته شده است. *Karyab* و همکاران (۱۶) غلظت مالاتیون را در آب‌های سطحی استان قزوین اندازه‌گیری کردند. بیشترین

خالص، سویه BNA1 پس از کشت در محیط نوترینت برات با کدورت نهایی ( $OD_{600nm}$ ) ۰/۱ به ارلن های شیاردار ۲۵۰mL حاوی ۵۰mL محیط پایه معدنی به همراه ۱۰۰μL مالاتیون خالص به عنوان تنها منبع کربن و انرژی با pH برابر با ۷ تلقیح شد. محیط پایه معدنی حاوی ۰/۵ g دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۱ g کلرید آمونیم، ۰/۰۱ g سولفات آهن، ۳ g کلرید سدیم و همچنین ۱ mL محلول عناصر میکرو در ۱۰۰۰ mL آب شرب بود. محلول عناصر میکرو شامل ۷۰mg کلرید روی، ۱۰۰ mg کلرید منگنز، ۲۰۰mg کلرید کبالت، ۱۰۰mg کلرید نیکل، ۲۰mg کلرید مس II، ۵۰mg مولیبدات سدیم، ۲۶mg سلنیت سدیم، ۱۰mg وانادات سدیم، ۳۰ mg ولفرامات سدیم، ۱ mL اسید کلریدریک ۲۵درصد و ۱۰۰۰mL آب مقطر بود. همه ارلن ها به مدت ۱۴ روز بر روی انکوباتور شیکر دار با دور ۱۳۰ rpm و دمای ۳۵°C و با سه تکرار گرماگذاری شد (۱۸).

#### میزان تجزیه زیستی مالاتیون توسط سویه های BNA1 و BNA2

جهت سنجش میزان تجزیه زیستی مالاتیون خالص توسط سویه های BNA1 و BNA2 پس از کشت در محیط نوترینت برات با کدورت نهایی ( $OD_{600nm}$ ) ۰/۱ (۰/۰۵) برای BNA1 و ۰/۰۵ (برای BNA2) به همراه و بدون Tween 80 از ارلن های ۲۵۰ mL حاوی ۵۰ mL محیط پایه معدنی به همراه ۲۰۰ μL مالاتیون خالص با pH برابر با ۷ استفاده شد، تیمارهای انجام شده در جدول ۱ آورده شده اند. همه ارلن ها به مدت ۱۴ روز بر روی انکوباتور شیکر دار با دور ۱۳۰ rpm و دمای ۳۵°C و با سه تکرار گرماگذاری شدند. پس از تعیین کارآمد ترین تیمار میزان کدورت سلولی جهت رسم منحنی رشد به صورت روزانه اندازه گیری شد. جهت اندازه گیری کدورت سلولی ۱ mL از محیط کشت برداشته و میزان جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ( $OD_{600nm}$ ) خوانده شد.

میزان مالاتیون ۱۸/۱۲ μg/L اندازه گیری شد. بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا غلظت مجاز آفت کش ها در آب های سطحی بین ۱-۳ μg/L است (۱۷). اگرچه تاکنون در زمینه شناسایی و اندازه گیری حشره کش مالاتیون در ایران مطالعاتی انجام شده است، اما در زمینه باکتری هایی که قادر به تجزیه این ترکیب هستند مطالعه ای انجام نشده است. لذا با توجه به استفاده آسان، کم هزینه و کارآمد زیست پالایی با داشتن دانش کافی می توان توانایی لازم را برای پالایش مناطق آلوده فراهم آورد. هدف ما در این مطالعه بررسی پتانسیل باکتری های جداسازی شده از مناطق کشاورزی و نفتی اروندکنار در تجزیه زیستی مالاتیون خالص و همچنین مطالعه تاثیر کشت میکس و استفاده از سورفکتانت در تجزیه زیستی مالاتیون توسط سویه های استفاده شده است.

#### مواد و روش ها

##### کشت سویه ها

در این مطالعه از سویه های BNA1 و BNA2 جداسازی شده از منطقه اروندکنار استفاده گردید. این منطقه به دلیل آن که از گذشته های دور در معرض آلاینده های هیدروکربنی مختلف بوده، احتمال یافتن سویه های کارآمد جهت زیست پالایی بیشتر است. به منظور ارزیابی میزان تجزیه زیستی مالاتیون توسط سویه های BNA1 و BNA2 از روش ارائه شده توسط Shahriari Moghadam و همکاران (۱۰) با کمی تغییرات استفاده شد. ابتدا سویه های مورد نظر در ارلن های شیاردار حاوی ۵۰ mL محیط کشت نوترینت برات بر روی انکوباتور شیکر دار با دور ۱۳۰ rpm و دمای ۳۵°C گرماگذاری شد. باکتری ها با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار Hermle Z323K رسوب داده شدند و از آنها جهت تلقیح محیط های کشت استفاده شد.

##### بررسی پتانسیل سویه BNA1 در تجزیه زیستی مالاتیون خالص

جهت بررسی توانایی سویه BNA1 در تجزیه مالاتیون

(ANOVA) و بررسی تفاوت میان تیمارهای مختلف و تجزیه زیستی مالاتیون با کمک آزمون Tukey تعیین گردید. آزمون‌های آماری فوق توسط نرم افزار SPSS-20 انجام شد.

### یافته‌ها

بررسی پتانسیل سویه BNA1 در تجزیه زیستی مالاتیون خالص نتایج نشان داد سویه‌های BNA1 به خوبی در محیط نوترینت برات رشد کرده و به کدورت لازم برای تلقیح به محیط پایه معدنی می‌رسد. نتایج کروماتوگرافی گازی نشان داد سویه BNA1 در ۵۰ mL محیط پایه معدنی حاوی ۱۰۰  $\mu\text{L}$  مالاتیون خالص به عنوان تنها منبع کربن و انرژی با pH برابر با ۷، دمای  $35^\circ\text{C}$ ، با دور ۱۳۰ rpm، قادر به تجزیه ۴۲ درصد از سم مالاتیون (در محیط پایه معدنی حاوی ۱۰۰  $\mu\text{L}$  مالاتیون خالص) هست. نمودار ۱ نشان‌دهنده محل قرارگیری پیک مالاتیون در کروماتوگرام ثبت شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی است، مالاتیون در زمان ۱۳/۹۷ min از ستون خارج شده است.

### میزان تجزیه زیستی مالاتیون توسط سویه های BNA1 و BNA2

نتایج آزمون شاپیرو نشان داد، داده‌ها از توزیع نرمال پیروی می‌کنند ( $n=18, p=0/40$ ). نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد ارتباط معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود دارد ( $n=18, p=0/03$ ). نتایج مقایسه دو به دو تیمارها براساس آزمون توکی در جدول ۲ آورده شده است. بیشترین میزان تجزیه مالاتیون در محیط پایه معدنی حاوی ۲۰۰  $\mu\text{L}$  مالاتیون خالص در تیمار شماره ۶ (۶۷/۷۹ درصد) و در حضور هر دو سویه استفاده شده (BNA1, BNA2) و Tween 80 بدست آمد. در حالی که کمترین میزان تجزیه زیستی مالاتیون (۲۶/۴۵ درصد) در تیمار شماره ۲ (سویه BNA2) بدست آمد. نتایج میزان تجزیه زیستی مالاتیون در تیمارهای مختلف در نمودار ۲ آورده شده است. نتایج میزان جذب نوری اندازه‌گیری شده در تیمار شماره ۶ (کارآمدترین

جدول ۱- تیمارهای مختلف انجام شده جهت مطالعه میزان تجزیه زیستی مالاتیون خالص توسط سویه‌های BNA1 و BNA2

تیمار	سویه استفاده شده	Tween 80 درصد
۱	BNA1	-
۲	BNA2	-
۳	BNA1 + BNA2	-
۴	BNA1	+
۵	BNA2	+
۶	BNA1 + BNA2	+

### استخراج و سنجش میزان مالاتیون

جهت استخراج مالاتیون از محیط‌های کشت (تمامی محیط کشت (۵۰ mL) استفاده شد) به هر ارلن ۲۵ mL اتیل استات اضافه و به مدت ۱۵ min به خوبی مخلوط گردید. سپس فاز آلی جدا شده و فاز آبی مجدداً توسط ۲۵ mL اتیل استات استخراج گردید. در پایان دو استخراج با هم مخلوط و توسط سولفات سدیم به طور کامل آب‌گیری شدند و حجم نهایی به ۵۰ mL رسانیده شد. در حدود ۱ mL از استخراج به ویال‌های ۱/۵ mL تیره منتقل و تا زمان آنالیز در فریزر نگهداری شدند. جهت آنالیز نمونه‌ها ۱  $\mu\text{L}$  از محلول استخراج شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 7890A مجهز به آشکارساز FID تزریق گردید. ستون استفاده شده در دستگاه از نوع HP-5MS موئین (Agilent) به طول ۳۰ m، قطر داخلی ۰/۲۵ و ۰/۲۵  $\mu\text{m}$  ضخامت لایه داخلی بود. دمای محفظه تزریق  $250^\circ\text{C}$ ، دمای آشکارساز  $250^\circ\text{C}$  بود و از گاز نیتروژن به عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای آون از  $80^\circ\text{C}$  به  $120^\circ\text{C}$  با نرخ  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  در دقیقه تنظیم گردید (۱۹).

### تجزیه و تحلیل آماری

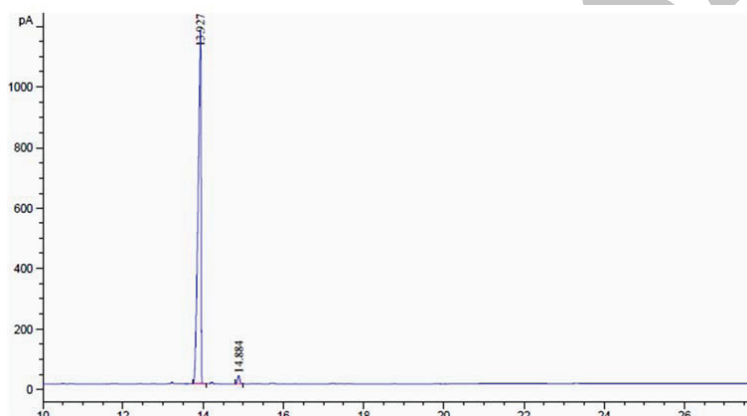
پس از بررسی نرمالیتی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو، مقایسه تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان تجزیه زیستی مالاتیون با استفاده از آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه (one-way)

باكتري وارد فاز رشد لگاريتمى شده و بيشترين ميزان جذب نورى 48 h پس از تلقیح سويه‌ها سنجش شد (نمودار ۳).

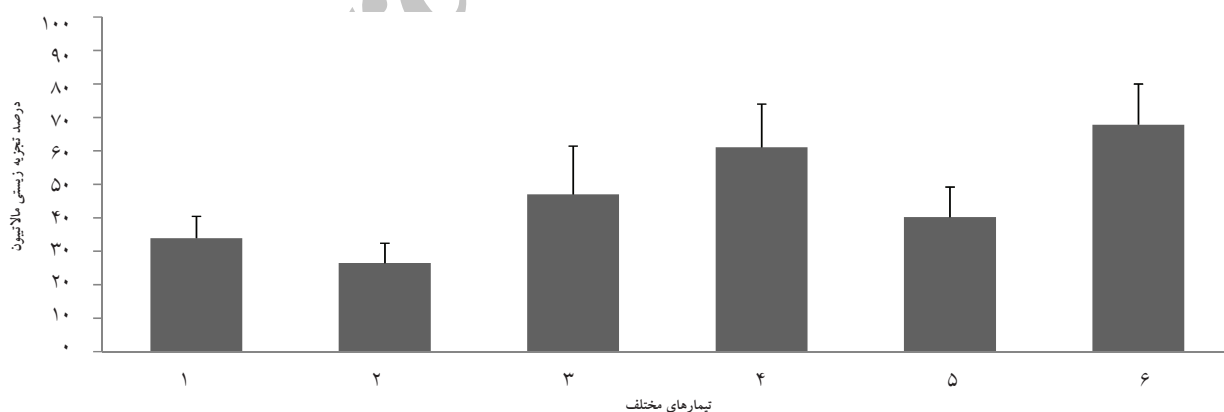
تيمار (نشان داد، در شروع آزمايش يك فاز تاخيري وجود دارد (۲۴ ساعت اول). در اين مرحله باكتري‌ها آنزيم‌ها و مواد لازم را براى وارد شده به فاز لگاريتمى سنتز مى‌کنند. پس از آن

جدول ۲- نتايج مقايسه دو به دوى تيمارهاى مختلف براساس آزمون توکى

BNA1 + BNA2+ M+1%Tween80	BNA2 + M+1%Tween80	BNA1+ M+1%Tween80	BNA1+BNA2+ M	BNA2+ M	BNA1+ M	تيمارهاى مختلف
۰/۰۲۱	۰/۹۷۶	۰/۰۷۵	۰/۶۷۲	۰/۹۵۱		BNA1+ M
۰/۰۰۵	۰/۶۳۰	۰/۰۱۸	۰/۲۴۸		۰/۹۵۱	BNA2+ M
۰/۲۳۴	۰/۹۶۶	۰/۶۰۵		۰/۲۴۸	۰/۶۷۲	BNA1+BNA2+ M
۰/۹۶۷	۰/۲۳۳		۰/۶۰۵	۰/۰۱۸	۰/۰۷۵	BNA1+ M+1%Tween80
۰/۰۶۹		۰/۲۳۳	۰/۹۶۶	۰/۶۳۰	۰/۹۷۶	BNA2 + M+1%Tween80
	۰/۰۶۹	۰/۹۶۷	۰/۲۳۴	۰/۰۰۵	۰/۰۲۱	BNA1 + BNA2+ M+1%Tween80

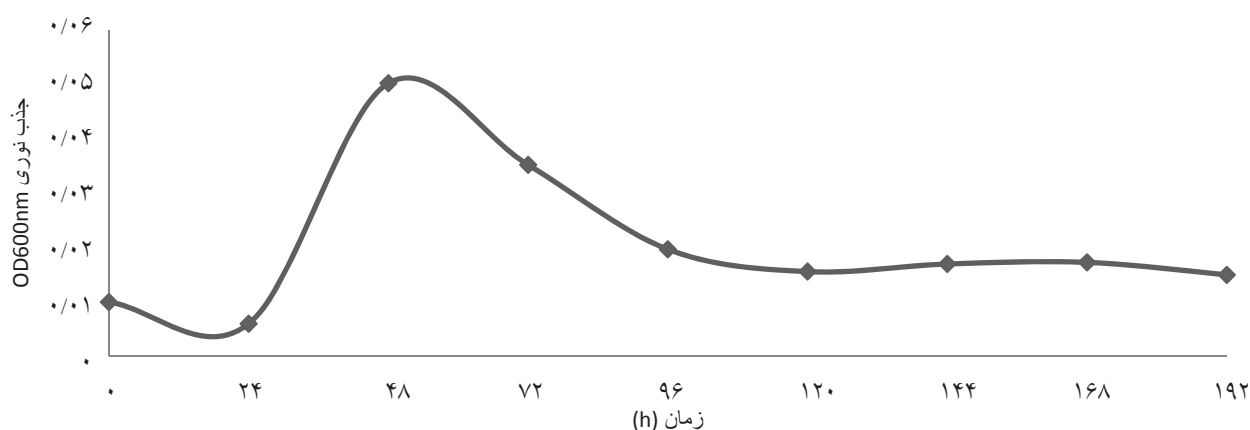


نمودار ۱- کروماتوگرام (کروماتوگرافی گازی) تجزيه زيستى مالتيون خالص، مالتيون در زمان 13/97 min از ستون خارج شده است.



نمودار ۲- درصد تجزيه مالتيون خالص در تيمارهاى مختلف

۱- BNA1 + مالتيون؛ ۲- BNA2 + مالتيون؛ ۳- BNA1 + BNA2 + مالتيون؛ ۴- BNA1 + مالتيون + Tween80؛ ۵- BNA2 + مالتيون + Tween80؛ ۶- BNA1 + BNA2 + مالتيون + Tween80.



نمودار ۳- میزان جذب نوری اندازه گیری شده (OD<sub>600nm</sub>) در تیمار شماره ۶

است که به لحاظ دارا بودن توانایی بالا در تجزیه مواد مختلف از جمله ترکیبات ارگانوفسفره شناخته می‌شوند (۲۵، ۲۶). همچنین سویه استفاده شده در این مطالعه قابلیت بالایی در تولید بیوسورفکتانت در محیط پایه معدنی دارا است. ترکیبات آلی آبگریز (مانند ارگانوفسفره) حلالیت کمی در محیط آبی دارند و تجزیه زیستی چنین ترکیباتی به دلیل دسترسی زیستی کم میکروارگانیسم‌ها به آنها محدود می‌شود. جهت افزایش میزان دسترسی آنها در محیط باید به نحوی میزان حلالیت آنها را در محیط افزایش داد. در فرم تجاری و فرموله شده، حلالیت مالاتیون با استفاده از امولسیفایرهای مختلف مانند انواع سورفکتانت‌ها افزایش می‌یابد. نتایج محققین نشان داده است افزایش حلالیت حشره کش‌ها، موجب افزایش در دسترس بودن حشره کش توسط میکروارگانیسم می‌شود، در نتیجه سرعت تجزیه زیستی نیز افزایش می‌یابد (۲۷، ۲۸).

به منظور مطالعه میزان تاثیر سورفکتانت‌ها بر تجزیه زیستی مالاتیون توسط سویه‌های BNA1 و BNA2 از Tween 80 استفاده شد. سورفکتانت‌ها ترکیبات دوگانه دوست بوده، کشش سطحی را کاهش می‌دهند و میزان حلالیت را در محیط آبی افزایش می‌دهند و در نتیجه موجب افزایش دسترسی زیستی به این ترکیبات می‌شود. نتایج مطالعات صورت گرفته در مورد

## بحث

فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی مقادیر قابل توجهی از مواد آلاینده را پیوسته وارد محیط زیست می‌کنند. حشره کش‌های ارگانوفسفره از جمله مهمترین آلاینده‌هایی هستند که با وجود سمیت بالا، به طور وسیع استفاده و پیوسته وارد محیط می‌شوند، در نتیجه نیاز به تکامل روش‌های کارآمد جهت پالایش مناطق آلوده ضروری است. سموم ارگانوفسفره توسط میکروارگانیسم‌های محیطی تجزیه می‌شوند، میکروارگانیسم‌ها با استفاده از آنزیم‌های فسفودی‌استراز، کربوکسیل‌استراز و همچنین ارگانوفسفات هیدرولاز سموم ارگانوفسفره را هیدرولیز و به موادی با سمیت کمتر تبدیل می‌کنند (۲۰). در مطالعه حاضر سویه‌های BNA1 و BNA2 جداسازی شده از رسوبات منطقه اروندکنار استفاده شدند. سویه BNA1، سویه‌ای از گونه *Serratia marcescens* است. چندین گزارش از تجزیه سموم ارگانوفسفره توسط *Serratia sp.* ارائه شده است (۲۱-۲۳). همچنین Xu و همکاران (۲۴) تجزیه زیستی سم ارگانوفسفره کلرپیریفوس را توسط مخلوطی از *Serratia sp.* و قارچ *Trichosporon sp.* مطالعه کردند. BNA2 سویه‌ای از گونه *Pseudomonas aeruginosa* هست. جنس سودوموناس شامل گونه‌هایی



(BNA1 + BNA2 + Malthion + Tween80)

مشاهده گردید. مطالعات نشان داده‌اند تجزیه زیستی توسط مخلوط باکتری‌ها نسبت به کشت خالص کارآمدتر هست. ساختار و تنوع یک جمعیت باکتریایی تعیین کننده توان متابولیکی آنها است (۳۴). این امر می‌تواند به دلیل توانایی بیشتر آنزیمی و همچنین فرایند های کومتابولیسمی مخلوط باکتریایی نسبت به سویه‌های خالص است (۳۵، ۳۶). مثال‌هایی از تجزیه ترکیبات شیمیایی مختلف توسط مجموع چندین گونه باکتریایی گزارش شده است. Singh و همکاران (۳۷) مطالعه‌ای با هدف تجزیه زیستی مالاتیون توسط میکسی از سویه‌های مختلف *Bacillus sp.* انجام دادند. نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از میکس باکتریایی در تجزیه مالاتیون نتیجه بهتری را نسبت به استفاده سویه‌ها به صورت خالص دارا است. نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نیز تأیید کننده نتایج این محققین است.

با توجه به آن که مطالعات صورت گرفته در زمینه تجزیه زیستی مالاتیون در شرایط مختلفی از غلظت مالاتیون و طول دوره آزمایش اجرا شده‌اند، انجام مقایسه نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر با نتایج دیگر محققین خالی از اشکال نیست. سویه *Acinetobacter baumannii* AFA قادر به تجزیه ۸۴ درصد از میزان مالاتیون موجود در محیط کشت (۱۰۰ mg/L) در طی ۱۴ روز است (۳۸) همچنین سویه *Bacillus cereus* PU و *Brevibacillus sp.* KB2 قادر به تجزیه ۳۶/۲۲ درصد و ۴۹/۳۱ درصد مالاتیون موجود در محیط کشت (۱۵۰ µL در ۱۰۰ mL محیط کشت) پس از ۷ روز بودند (۱۱). در مطالعه حاضر بیشترین میزان تجزیه زیستی ۶۷ درصد به دست آمده است که نسبت به نتایج Singh و همکاران (۱۱) بیش تر و نسبت به نتایج Azmy و همکاران (۳۸) کمتر است. شایان ذکر است در مطالعه حاضر شرایط بهینه تجزیه زیستی مالاتیون توسط سویه‌های استفاده شده تعیین نشده است، در صورت تعیین شرایط بهینه ممکن است بتوان در زمان کمتر به بیشترین میزان تجزیه زیستی رسید.

تأثیر سورفکتانت‌ها بر میزان تجزیه زیستی خیلی متنوع است، استفاده از سورفکتانت‌ها در زیست پالایی آلاینده‌ها، موجب افزایش حلالیت آنها و در نتیجه تجزیه آنها در محیط می‌شود، اگرچه در برخی موارد استفاده از آنها در زیست پالایی بی اثر و یا حتی دارای اثرات منفی بوده است (۲۹) نتایج تحقیق حاضر نشان داد استفاده از سورفکتانت موجب افزایش قابل ملاحظه‌ای در تجزیه زیستی مالاتیون توسط سویه‌های استفاده شده می‌شود (۲۷/۱۷ و ۱۳/۷۲ درصد به ترتیب توسط BNA1 و BNA2).

نتایج میزان تجزیه مالاتیون در تیمار ۳ (BNA1+BNA2+ Malathion) نشان داد استفاده از سویه BNA2 با قابلیت تولید بیوسورفاکتانت موجب افزایش کارایی سویه BNA1 در تجزیه زیستی مالاتیون می‌شود (۱۳/۰۸ درصد). بیوسورفاکتانت‌ها نیز مانند سورفاکتانت‌ها ترکیبات دوگانه دوست بوده و کشش سطحی را کاهش می‌دهند، ترکیباتی غیرسمی، بی‌خطر، زیست تخریب پذیر بوده و موجب افزایش در دسترس بودن ترکیبات نامحلول در محیط آبی می‌شوند (۳۰) گزارش‌هایی از تجزیه سموم ارگانوفسفره به کمک بیوسورفاکتانت‌ها ارائه شده است. Singh و همکاران (۳۱) در تحقیقی از تجزیه سم ارگانوفسفره کلروپیریفوس به کمک بیوسورفاکتانت تولید شده از *Pseudomonas sp.* خبر دادند. همچنین گزارشی از تأثیر بیوسورفاکتانت بر تجزیه سموم ارگانوفسفره توسط باکتری *Nocardia mediterranie* ارائه شده است (۳۲) که نتایج ما نیز یافته‌های این محققین را تأیید می‌کند. کنترل و تعیین شرایط زیست پالایی امری پیچیده بوده و فاکتورهای مختلفی از قبیل وجود جمعیت باکتریایی با توان تجزیه زیستی آلاینده، دسترسی میکروارگانیسم‌ها به مواد آلاینده و دیگر شرایط محیطی در آن اهمیت دارند. جهت دستیابی به راندمان بالا در تجزیه زیستی، کنترل و تعیین شرایط زیست پالایی اهمیت ویژه‌ای دارد (۳۳). در مطالعه حاضر بیشترین میزان تجزیه زیستی (۶۸/۴۲ درصد) در تیمار شماره ۶

## نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد سویه‌های استفاده شده در این مطالعه توانایی قابل توجهی در تجزیه مالاتیون دارند. با توجه به آن که سویه‌های استفاده شده در این مطالعه قادر به تجزیه مالاتیون در غلظت بالای اولیه هستند می‌توان از آنها در مناطقی که میزان آلودگی بالا است نیز استفاده نمود. همچنین بهترین کارایی این سویه‌ها زمانی بدست می‌آید که به صورت میکس استفاده شوند. نتایج این مطالعه پس از انجام مطالعات

پایلوت می‌تواند برای زیست پالایی مناطق آلوده به سموم ارگانوفسفره استفاده گردد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان جداسازی، شناسایی و تعیین شرایط بهینه رشد باکتری (های) تجزیه کننده سم ارگانوفسفره مالاتیون از منطقه اروندکنار در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۳ است که با حمایت دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است.

## منابع

1. Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006;30(3):428-71.
2. El-Queny F, Abdel-Megeed A. Phytoremediation and detoxification of two organophosphorous pesticides residues in Riyadh area. *World Applied Sciences Journal*. 2009;6(4):570-78.
3. Dhoub IE-B, Lasram MM, Annabi A, Gharbi N, El-Fazaa S. A comparative study on toxicity induced by carbosulfan and malathion in Wistar rat liver and spleen. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2015;124:21-28.
4. González-Alzaga B, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Rodríguez-Barranco M, Ballester F, Rebagliato M, et al. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. *Toxicology Letters*. 2014;230(2):104-21.
5. Waddell BL, Zahm SH, Baris D, Weisenburger DD, Holmes F, Burmeister LF, et al. Agricultural use of organophosphate pesticides and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among male farmers (United States). *Cancer Causes & Control*. 2001;12(6):509-17.
6. Gavrilescu M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*. 2005;5(6):497-526.
7. Ramos-Delgado N, Hinojosa-Reyes L, Guzman-Mar I, Gracia-Pinilla M, Hernández-Ramírez A. Synthesis by sol-gel of WO<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> for solar photocatalytic degradation of malathion pesticide. *Catalysis Today*. 2013;209:35-40.
8. Zhang Y, Pagilla K. Treatment of malathion pesticide wastewater with nanofiltration and photo-Fenton oxidation. *Desalination*. 2010;263(1):36-44.
9. Mohamed K, Basfar A, Al-Kahtani H, Al-Hamad K. Radiolytic degradation of malathion and lindane in aqueous solutions. *Radiation Physics and Chemistry*. 2009;78(11):994-1000.
10. Shahriari Moghadam M, Ebrahimipour G, Abtahi B, Ghassempour A. Isolation, identification and optimization of phenanthrene degrading bacteria from the coastal sediments of Nayband Bay. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2013;6(9): e13816.
11. Singh B, Kaur J, Singh K. Transformation of malathion by *Lysinibacillus* sp. isolated from soil. *Biotechnology Letters*. 2012;34(5):863-67.
12. Li X, He J, Li S. Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the mpd gene. *Research in Microbiology*. 2007;158(2):143-49.
13. Struthers J, Jayachandran K, Moorman T. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(9):3368-75.
14. Okamoto Y, Shibamoto T. Degradation of malathion, in aqueous extracts of asparagus (*Asparagus officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(19):5919-23.
15. Shan X, Junxin L, Lin L, Chuanling Q. Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. *Journal of Environmental Sciences*. 2009;21(1):76-82.
16. Karyab H, Mahvi AH, Nazmara S, Bahojb A. Determination of water sources contamination to diazi-



- non and malathion and spatial pollution patterns in Qazvin, Iran. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013;90(1):126-31.
17. Fadaei A, Dehghani MH, Nasser S, Mahvi AH, Rastkari N, Shayeghi M. Organophosphorous pesticides in surface water of Iran. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2012;88(6):867-69.
18. Schlegel H. *Allgemeine Mikrobiologie*. Germany: Georg Thieme Verlag; 1992.
19. Bavcon M, Trebše P, Zupančič-Kralj L. Investigations of the determination and transformations of diazinon and malathion under environmental conditions using gas chromatography coupled with a flame ionisation detector. *Chemosphere*. 2003;50(5):595-601.
20. Makkar RS, DiNovo AA, Westwater C, Schofield DA. Enzyme-mediated bioremediation of organophosphates using stable yeast biocatalysts. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 2013;4:182. doi:10.4172/2155-6199.1000182.
21. Abo-Amer AE, Amer AEA. Biodegradation of diazinon by *Serratia marcescens* DI101 and its use in bioremediation of contaminated environment. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;21(1):71-80.
22. Cycoń M, Żmijowska A, Wójcik M, Piotrowska-Seget Z. Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. *Journal of Environmental Management*. 2013;117:7-16.
23. Kannan V, Vanitha V. Influence of assay medium on degradation of malathion by *Serratia marcescens*. *Indian Journal of Biotechnology*. 2005;4(2):277-83.
24. Xu G, Li Y, Zheng W, Peng X, Li W, Yan Y. Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp. *Biotechnology Letters*. 2007;29(10):1469-73.
25. Abo-Amer A. Involvement of chromosomally-encoded genes in malathion utilization by *Pseudomonas aeruginosa* AA112. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2007;54(3):261-77.
26. Imran H, Altaf KM, Jong-Guk K. Degradation of malathion by *Pseudomonas* during activated sludge treatment system using principal component analysis (PCA). *Journal of Environmental Sciences*. 2005;18(4):797-804.
27. Chowdhury A, Pradhan S, Saha M, Sanyal N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*. 2008;48(1):114-27.
28. Shahgholi H, Gholamalizadeh Ahangar A. Factors controlling degradation of pesticides in the soil environment A Review. *Agriculture Science Developments*. 2014;3(8):273-78.
29. Laha S, Luthy RG. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environmental Science & Technology*. 1991;25(11):1920-30.
30. Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(1):633-54.
31. Singh P, Sharma S, Saini H, Chadha B. Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. *Letters in Applied Microbiology*. 2009;49(3):378-83.
32. Sukirtha T, Usharani M. Production and qualitative analysis of biosurfactant and biodegradation of the organophosphate by *Nocardia mediterranea*. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 2013;4:198. doi: 10.4172/2155-6199.1000198.
33. Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 1990;54(3):305-15.
34. Galvão TC, Mohn WW, de Lorenzo V. Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends in Biotechnology*. 2005;23(10):497-506.
35. Casellas M, Grifoll M, Sebete J, Solanas A. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Canadian Journal of Microbiology*. 1998;44(48):734-42.
36. Sugiura K, Ishihara M, Shimauchi T, Harayama S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science & Technology*. 1996;31(1):45-51.
37. Singh B, Kaur J, Singh K. Bioremediation of malathion in soil by mixed *Bacillus* culture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013;4(5):674-78.
38. Azmy AF, Saafan AE, Essam TM, Amin MA, Ahmed SH. Biodegradation of Malathion by *Acinetobacter baumannii* Strain AFA Isolated from Domestic Sewage in Egypt. *Biodegradation*. 2014;34(5):863-67.



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



## Biodegradation of Malathion using mixed culture of *Serratia marcescens* BNA1 and *Pseudomonas aeruginosa* BNA2

B. Nadalian<sup>1</sup>, M. Shahriari Mogadam<sup>2\*</sup>, G.H. Ebrahimipour<sup>1</sup>, B. Nadalian<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University, GC, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Department of Environment, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Sistan va Blaoochestan, Iran

### ARTICLE INFORMATION:

**Received:** 17 October 2015;

**Accepted:** 11 January 2016

**Key words:** Malathion, biodegradation, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*

**\*Corresponding Author:**  
[mohsen.shahriari@uoaz.ac.ir](mailto:mohsen.shahriari@uoaz.ac.ir)  
**Mob:** +989122508847  
**Fax:** +98 54222882

### ABSTRACT

**Background and Objectives:** Organophosphate pesticides are used most commonly for domestic, commercial, and agricultural purposes and have been found to be highly toxic. In essence, bioremediation has become one of the most important tools for removing these compounds in the environment, considering its higher efficiency when compared with the physicochemical methods.

**Materials and Methods:** The biodegradation efficiency of two bacterial strains (i.e. *Serratia marcescens* BNA1 and *Pseudomonas aeruginosa* BNA2) were assessed. In order to evaluate Malathion biodegradation, each sample was cultured on mineral salts medium containing Malathion as a sole carbon source. Malathion biodegradation efficiency of the strains was monitored in different culture media. The ability of bacterial isolates to degrade Malathion was studied using gas chromatography.

**Results:** *Serratia marcescens* BNA1 and *Pseudomonas aeruginosa* BNA2 were able to degrade Malathion. Biodegradation percentage in different treatments recorded were: BNA1+Ma (33.88%), BNA2+MA (26.45%), BNA1+BNA2+Ma (46/96%), BNA1+Ma+Tween (61.05%), BNA2+Ma+Tween (40.17%), and BNA1+BNA2+Ma+ Tween (67.79%).

**Conclusion:** It could be speculated that the best degradation efficiency can be yielded using mixture of strains plus a surfactant. The results of this study can be used in the bioremediation of Malathion contaminate soil after doing the pilot experiments.

Please cite this article as: Nadalian B., Shahriari Mogadam M., Ebrahimipour G.H., Nadalian B. Biodegradation of Malathion using mixed culture of *Serratia marcescens* BNA1 and *Pseudomonas aeruginosa* BNA2. Iran. J. Health & Environ 2016; 8(4): 525-534.