Archive of SID

Journal of Plant Protection
Vol. 25, No. 2, Summer 2011, P. 224-227

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ص. ۲۲۷-۲۲۴

مقاله کوتاه پژوهشی

تجزیه زیستی آترازین در غلظت های گوناگون به وسیله باکتری های سودوموناس

دانیال رضایی [۱*]- غلامحسین حق‌نیا [۲]- امیر لکزیان [۳]- محمد حسن زاده خیاط [۴]- حوریه نصیرلی [۵]

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۱۳
تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۲۲

چکیده

استفاده گسترده از آترازین و به دنبال آن سمیت این علف‌کش در محیط زیست، توجه پژوهشگران را در زمینه پیدا کردن روش های نوین پالایش این آلاینده آلی به خود معطوف کرده است. یکی از روش های موثر در حذف آترازین از محیط زیست، روش تجزیه زیستی می‌باشد. با توجه به اهمیت آترازین به عنوان یک آلاینده آلی زیست محیطی، مطالعه‌ای بصورت طرح کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل در زمینه تجزیه زیستی این علف کش با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو گونه باکتری سودوموناس آرژینوزا و سودوموناس فلورسنس و سه غلظت آترازین (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) بودند. نتایج آزمایش نشان دادند که باکتری‌های جنس سودوموناس به طور معنی‌داری منجر به تجزیه آترازین شدند. باکتری سودوموناس فلورسنس آترازین را ۴۵ درصد و باکتری سودوموناس آرژینوزا ۳۸/۸۸ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت تجزیه کردند. باکتری فلورسنس به گونه‌ای معنی‌دار توان تجزیه بیشتری نسبت به باکتری آرژینوزا داشت. همچنین نتایج آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت، تجزیه آترازین به وسیله هر دو باکتری افزایش یافت به گونه‌ای که بیشترین درصد تجزیه به وسیله هر دو باکتری سودوموناس در غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی داد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی، علف‌کش آترازین و باکتری‌های سودوموناس فلورسنس و آرژینوزا

مقدمه

آفت‌کش‌ها گروه ویژه‌ای از ترکیب‌های شیمیایی هستند که در حفظ سلامت عمومی و تولیدات کشاورزی نقش مهمی ایفا می کنند. استفاده گسترده از این مواد منجر به ورود مقادیر زیادی از آنها به منابع آب و خاک شده و به عنوان تهدیدی برای محیط زیست به شمار می روند. یکی از دلایل عمده آلودگی آبهای زیرزمینی، عدم کنترل کافی و رهاسازی سموم در محل های مصرف آنهاست و پالایش خاک و آبهای زیرزمینی آلوده شده در این مناطق یکی از مهم‌ترین مشکلات محیطی به شمار می‌رود (۳). علف‌کش آترازین با نام علمی (۲کلرو-۴ اتیل آمینو-۶ ایزو پروپیل آمینو-۱،۳،۵ تریازین) شایع‌ترین و پرمصرف‌ترین علف‌کش خانواده اس- تریازین‌های متقارن می‌باشد. بدلیل تحرک زیاد و نیمه عمر نسبتا طولانی آترازین در خاک، متابولیت های این علف‌کش در آبهای سطحی و زیرزمینی دیده می شود (۹). تجزیه زیستی به عنوان مهمترین فرآیندی است که ضایعات آلی بطور زیستی در شرایط کنترل شده به کمک موجودات زنده تجزیه می‌شوند (۸). تجزیه و معدنی شدن آترازین به وسیله باکتری‌های گوناگونی گزارش شده است و ریزجانداران زیادی از جمله باکتری‌ها مانند جنس‌های سودوموناس، اکتینوباکتر، اگروباکتریوم، آرتروباکتر، راستونیا و نورکادیا در معدنی کردن آترازین مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۹). هدف از این پژوهش، بررسی تجزیه زیستی غلظت‌های گوناگون آترازین به وسیله باکتری‌های سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا بود.

مواد و روش‌ها

تیمارهای آزمایش شامل دو گونه باکتری سودوموناس فلورسنس (P.F) و سودوموناس آرژینوزا (P.A) و سه سطح غلظت آترازین (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. در این آزمایش محیط کشت نمکهای معدنی
اصلاح شده شامل ۱/ ۰۴۸ گرم KH_2PO_4، ۰/۹۲۸ گرم

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناس ارشد، استاد و دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: Danirezaie@yahoo.com)
۴- مسئول بخش آنالیز مرکز تحقیقات علوم دارویی و استاد دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۵- کارشناس آزمایشگاه آنالیز مرکز تحقیقات علوم دارویی

www.SID.ir

Archive of SID

K_2HPO_4، ۰/۶۰۸ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۰۳۶ گرم NaCl، ۰/۰۳۶ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۱۲۴ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۱۳ گرم $FeCl_3.6H_2O$ و ۱/۰ گرم گلوکز در لیتر آب مقطر با pH ۶/۹ استفاده شد (۲). انتخاب سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر آترازین با استفاده از روش تست حداقل غلظت بازدارنده (MIC) انجام شد (۴). غلظت‌های انتخابی از استوک ۱۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر آترازین در متانول تهیه شدند. برای انجام آزمایش، ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در اتوکلاو برای ۱۵ دقیقه در فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد استریل شدند. بعد از سرد شدن محیط‌های کشت، از استوک ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آترازین در متانول سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر آترازین تهیه و به محیط‌های کشت افزوده شدند. در مرحله بعد باکتری های رشد یافته در محیط کشت مایع با دانسیته نوری ۰/۷ (در طول موج ۶۶۰ نانومتر) و تعداد سلول ۱۰۸×۱/۶ در هر میلی لیتر، بطور جداگانه به تیمارهای اصلی افزوده شد و ارلن‌ها در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت شیک شدند. مقدار ۲ میلی لیتر از نمونه ها در شروع آزمایش و ۴۸ ساعت پس از تلقیح انتخاب و سپس برای مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و مقدار آترازین نمونه ها با دستگاه HPLC قرائت شد.

دستگاه HPLC مدل شیمادزو، مجهز به ستون C18 (طول ۲۵ سانتیمتر) و آشکارساز ماورائ بنفش بود. سرعت جریان استفاده شده برابر ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه بود، فاز متحرک با نسبت ۸۰ به ۲۰ متانول (HPLC Grade) به آب مقطر انتخاب شد و طول موج انتخابی در ۲۲۰ نانومتر تنظیم شد. پیک مربوط به علف‌کش آترازین پس از ۱۲ دقیقه در آشکارساز ظاهر شد. داده‌های حاصل از آزمایش به وسیله نرم افزار MSTAT-C و مقایسه میانگین داده ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از آزمایش نشان داد، آترازین به وسیله هر دو باکتری سودوموناس به طور معنی‌دار ($P<0.01$) در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد تجزیه شد، لیکن باکتری سودوموناس فلورسنس توانایی بیشتری در تجزیه آترازین نسبت به سودوموناس آرژینوزا داشت. سودوموناس فلورسنس و آرژینوزا به ترتیب آترازین را ۴۵ و ۳۸/۸۸ درصد در مدت ۴۸ ساعت تجزیه کردند. در این آزمایش مشخص شد که دو گونه دیگر سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا علاوه بر باکتری سودوموناس نژاد ADP 5)، قابلیت تجزیه آترازین را دارند. در همین راستا پژوهشگران تجزیه آترازین را به وسیله باکتری‌های گوناگونی مورد بررسی قرار داده اند. پاراگ و همکارن (۶)، گزارش کردند باکتری آرتروباکتر MCM- B436، ۹۷/۹۸ درصد آترازین (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) را در محیط کشت نمکهای معدنی به عنوان تنها منبع نیتروژن و کربن در مدت ۳۰ ساعت تجزیه کرد. در این آزمایش تاثیر غلظت‌های گوناگون آترازین بر توان تجزیه کنندگی باکتری های سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا نشان داد که با افزایش غلظت، تجزیه علف‌کش آترازین به وسیله هر دو گونه سودوموناس به گونه‌ای معنی‌دار افزایش یافت. سودوموناس فلورسنس آترازین را در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب ۲۱/۳۳، ۳۰/۶۶ و ۸۲ درصد و سودوموناس آرژینوزا نیز به ترتیب ۱۱/۶۶، ۳۰/۶۶ و ۷۴/۳۳ درصد تجزیه کردند (شکل ۱).

همان گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین درصد تجزیه آترازین در غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به وسیله هر دو باکتری صورت گرفته است لیکن سودوموناس فلورسنس توان بیشتری نسبت به سودوموناس آرژینوزا در تجزیه آترازین داشت.

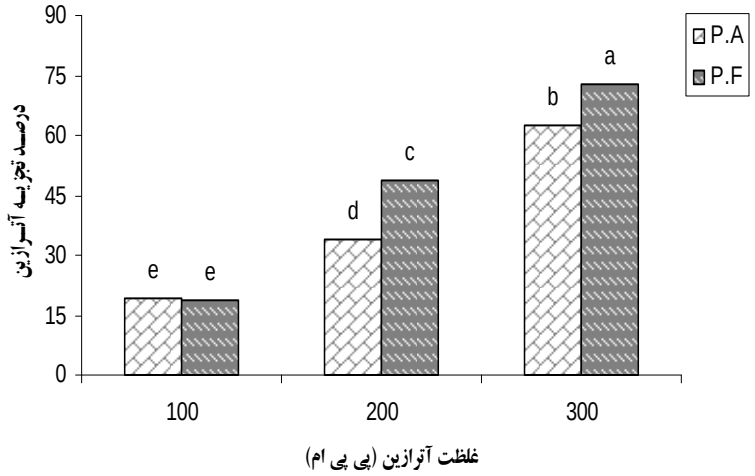
مندلبیوم (۵) گزارش کرد که باکتری سودوموناس ADP (تعداد سلول ۹×۹۱۰ در میلی‌لیتر) آترازین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر را در مدت زمان ۹۰ دقیقه کاملا تجزیه کرد و همچنین این باکتری در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آترازین در محیط کشت آگار نیز رشد کرد. سینگ و همکاران (۷)، در آزمایشی تجزیه آترازین را بوسیله باکتری اسینتوباکتر بومی خاک های آلوده به علف کش آترازین بررسی کردند. آنها گزارش کردند که این باکتری توان تجزیه آترازین را تا غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر را داشت. با توجه به اینکه آترازین در ساختار شیمیایی خود دارای عنصرهای نیتروژن و کربن می‌باشد (۵)، با افزایش غلظت و پس از تطبیق باکتری ها با وضعیت موجود، انتظار می‌رود که باکتری‌ها از آترازین به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن استفاده کنند. در غلظت کم آترازین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) باکتری ها دارای رشد معمولی خود بوده و از عنصرهای غذایی موجود در محیط کشت استفاده می کنند، لیکن در غلظت های بالای آترازین ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر به دلیل افزایش مقدار آترازین و فراهمی زیاد عنصرهای کربن و نیتروژن، ژن های AtzA، AtzB و AtzC موجود در پلاسمید باکتری‌ها که مسئول کد کردن آنزیم‌های تجزیه کننده آترازین می باشند، فعال شده و آترازین را به اسید سیانوریک تبدیل می کنند (۱). مقادیر غلظت‌های آترازین بکار برده شده در این آزمایش، نه تنها مانع رشد باکتری‌ها نشد بلکه در کنار عنصرهای غذایی موجود در محیط کشت به عنوان منبع غذایی (کربن و نیتروژن) استفاده شدند که این موضوع در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بارزتر بود. با توجه به میکروبی بودن فرایند تجزیه آترازین، افزایش تجزیه سم در غلظت‌های زیاد را می توان به افزایش قدرت تجزیه کنندگی باکتری ها به دلیل ایجاد تطابق در غلظت‌های بالا

www.SID.ir

Archive of SID

نسبت داد (۱). گان و همکاران (۳)، گزارش کردند که با افزایش غلظت مقدار آترازین در غلظت‌های ۵، ۵۰، ۵۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در یک دوره ۲۸۰ روزه انکوباسیون مقدار سم تجزیه شده (وزنی) به ترتیب برابر ۰/۱۲، ۱/۲، ۱۲ و ۱۰۹ میلی‌گرم در کیلوگرم بوده است که نشان می‌دهد با افزایش غلظت، مقدار آترازین تجزیه شده همواره افزایش یافته است.

به طور کلی باکتری‌های سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا توان تجزیه آترازین در غلظت‌های انتخابی (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) در این آزمایش را در شرایط آزمایشگاهی داشتند و حتی این باکتری ها توان رشد در غلظت زیاد آترازین ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر در محیط کشت جامد را داشتند. می توان گفت باکتری‌های سودوموناس می‌توانند نقش مهمی را در تجزیه آترازین در محیط زیست ایفا کنند. این باکتری‌ها قادرند که از علف‌کش آترازین به عنوان منبع غذایی استفاده کنند و این علف کش را از محیط زیست حذف کنند و یا سمیت آن را کاهش دهند.



شکل ۱- درصد تجزیه آترازین در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ قسمت در میلیون به‌وسیله باکتری‌های سودوموناس فلورسنس (P.F) و سودوموناس آرژینوزا (P.A)

منابع

۱- حق نیا غ. و رضوی ا. ۱۳۸۷. پالایش خاک و آب آلوده به آفت کشها. چاپ اول انتشارات سازمان حفاظت محیط زیست، تهران

2- Behiki R. M.، and Khan S. U. 1986. Degradation of atrazine by Pseudomonas: N dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. J. Agric. Food Chem. 34:748-749.

3- Gan J., Becker R. L., Koskinen W. C., and Buhler D. D. 1996. Degradation of atrazine in two soil as a function of concentration. Journal of Enviro. Qual. 25: 1064-1072.

4- Herbicide factsheet، Atrazine: Toxicology. 2001. Journal of Pesticide Reform، 21: No. 2.

5- Mandelbaum R. T., Allan D. L. and Wackett L. P. 1995. Isolation and Characterization of a Pseudomonas sp. that Mineralizes the S-Triazine Herbicide Atrazine. Journal of Applied and Environmental Microbiology 61: 1451–1457.

6- Parag A. Vaishampayan، Pradnya P. Kanekar_، Prashant K. Dhakephalkar. 2007. Isolation and characterization of Arthrobacter sp. strain MCM B-436، an atrazine-degrading bacterium، from rhizospheric soil. Journal of International Biodeterioration & Biodegradation 60: 273–278

7- Pooja Singh C.R. Suri، and Swaranjit Singh Cameotra. 2004. Isolation of a member of Acinetobacter species involved in atrazine degradation. Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications 317: 697–702

www.SID.ir

Archive of SID

8- Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. Journal of Pure Appl. Chem.، 73: No. 7، 1163–1172.

9- Yang C., Li Y., Zhang K., Wang X., Ma C., Tang H., and Xu P. 2009. Atrazine degradation by a simple consortium of Klebsiella sp. A1 and Comamonas sp. A2 in nitrogen enriched medium. Journal of Biodegradation: 9284-9.

www.SID.ir