فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۰، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۵۱- ۶۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده سم آلی کشاورزی فنیتروتیون از باغات پسته استان کرمان

مهرنوش غفاری *: کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم و تحقیقات شعبه مرکزی اراک، ایران، mehrnoushghafari@gmail.com
مهدی حسن‌شاهیان: استادیار میکروب‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، hasanshahi@gmail.com
محمد ماهانی: استادیار شیمی تجزیه، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، mohmahani@gmail.com

چکیده

مقدمه: سموم آلی کشاورزی از ساختار پیچیده مولکولی برخوردارند. همچنین، در اکوسیستم‌ها و بیوسفر زمین دارای پایداری بالایی هستند. این سموم با تاثیر بر شرایط خاک و تخریب و کاهش توان زراعی، اثرات مخربی برکیفیت زندگی انسان می‌گذارند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سم آلی کشاورزی فنیتروتیون نمونه‌برداری از باغ‌های پسته استان کرمان انجام شد. با استفاده از روش غنی‌سازی در محیط بوشنل- هاس همراه با سم آلی مورد نظر (فنیتروتیون) به عنوان منبع کربن، باکتری‌های تجزیه کننده جداسازی شدند. سپس، با انجام PCR برای تکثیر قسمتی از ژن *16S rRNA* سویه‌های برتر تجزیه کننده، تعیین توالی و شناسایی شدند.

نتایج: نتایج به دست آمده نشان داد اکوسیستم خاک باغ‌های پسته دارای باکتری‌های تجزیه کننده مناسبی برای حذف سم فنیتروتیون از خاک و در نهایت محیط زیست هستند. در مجموع، ۳ سویه باکتریایی تجزیه کننده سم آلی فنیتروتیون شناسایی شدند. این ۳ سویه شامل: باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens strain F1*، *Bacillus cereus strain F3* و *Pseudomonas aeruginosa strain F4* بودند. در ادامه اثر غلظت سم بر رشد سویه برتر تجزیه کننده بررسی شد. تجزیه کننده برتر فنیتروتیون (سویه F4) تا غلظت ۱۰۰ppm رشد را نشان داد. پس از این غلظت، کاهش رشد باکتری مشاهده شد. نتایج حاصل از گاز کروماتوگرافی قدرت تجزیه سم آلی توسط باکتری‌های تجزیه کننده را تایید نمود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد باکتری‌های تجزیه کننده سم آلی کشاورزی (فنیتروتیون) در اکوسیستم خاک باغ‌های پسته استان کرمان به عنوان قطب پسته کشور وجود دارد. انتظار می‌رود با استفاده از این باکتری‌ها و استفاده از روش‌های احیا زیستی بتوان مشکلات زیست محیطی ناشی از تاثیرات این سم آلی را کاهش داد.

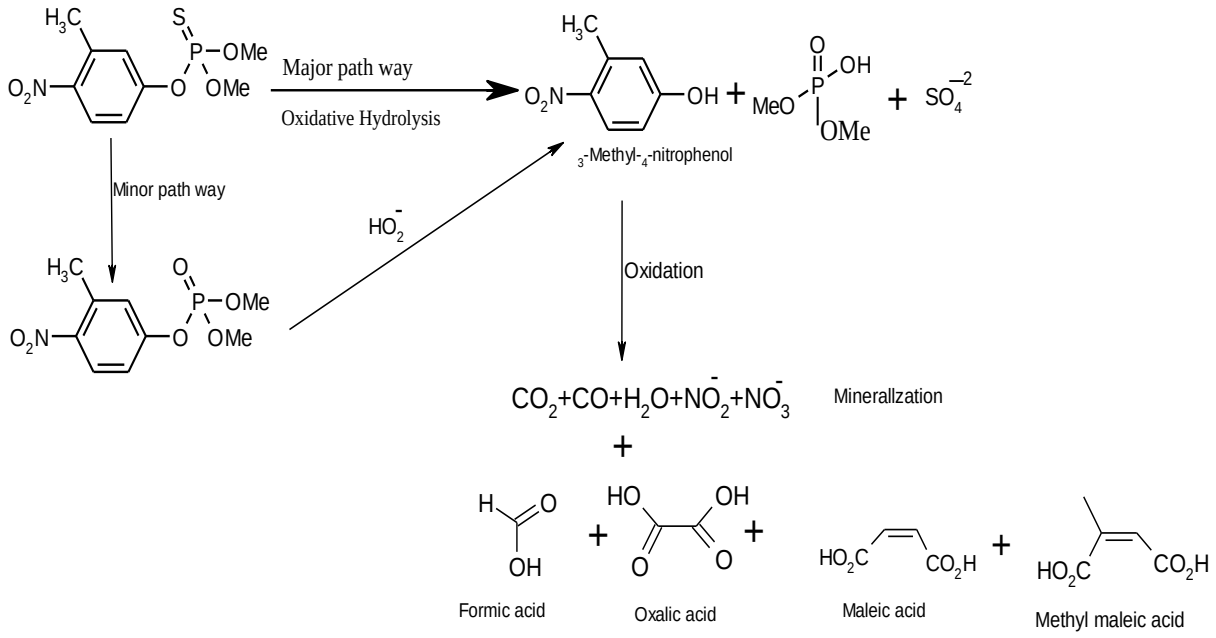
واژه‌های کلیدی: سودوموناس، تجزیه زیستی، فنیتروتیون، کرمان، کشاورزی

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

توسعه کشاورزی و تنوع آفات از مهم‌ترین عوامل مصرف روز افزون آفت کش‌ها در سراسر جهان به ویژه کشورهای رو به توسعه می‌باشند. ترکیبات ارگانوفسفره گسترده‌ترین حشره کش‌های مورد استفاده در دنیا هستند. گزارش‌ها نشان می‌دهد که قسمت‌های زیادی از آب و اکوسیستم‌های زمین به این ترکیبات آلوده هستند (۱). فنیتروتیون حشره‌کش ارگانوفسفره‌ای با طیف گسترده است که در صورت حرارت داده شدن، گازهای سمی تولید می‌کند. این سم آلی در شرایط طبیعی مایعی به رنگ زرد قهوه‌ای با بوی مشخص است. فنیتروتیون با فرمولاسیون مختلف وارد بازار می‌شود (۲). به علت حلالیت کم در آب، نفوذ آن به آب‌های زیرزمینی نیز کم اما اتصال آن به خاک کمابیش شدید است و بسته به میزان هوادهی هفته‌ها تا ماه‌ها در خاک و حتی در آب باقی می‌ماند. مقادیر بسیار کمی از آن تبخیر و در فاصله چند روز تا چند هفته در جو تجزیه می‌شود. البته نمی‌توان اثرات زیست محیطی جهانی آن را نادیده گرفت. امولسیون فنیتروتیون در جانداران آبزی قابلیت تجمع دارد و در آب سخت نیز پایداری خوبی از خود نشان می‌دهد(۲ و ۳). پسته مهم‌ترین محصول ارز-آور کشاورزی و پس از نفت و فرش سومین کالای مهم صادراتی ایران است. استان کرمان، بزرگ‌ترین تولیدکننده پسته در کشور است. میزان تولید پسته استان کرمان حدود ۸۹/۷ هزار تن می باشد که شهرستان رفسنجان با ۳۹/۸ درصد تولید استان، مقام اول را دارد. برای درختان پسته و میوه آن، حدود ۵۳ تا ۶۰ آفت و حدود ۹ تا ۱۱ بیماری وجود دارد. به شکل تصادفی از ۴۰ تا ۱۰۰ درصد خسارت باغ‌های پسته کشور، به آفات و بیماری‌ها مربوط است. در حال حاضر هم تعداد آفات و بیماری‌ها و هم خسارات آن‌ها در حال افزایش است. فنیتروتیون و دیازینون از مهم‌ترین آفت‌کش‌های فسفره‌ای هستند که در باغ‌های پسته استفاده می‌شوند(۴). آفت‌کش‌ها به واسطه عوامل شیمیایی، فیزیکی و زیستی از خاک حذف می‌شوند. برخی از آفت‌کش‌ها بسیار سریع توسط میکروارگانیسم‌ها تجزیه می‌شوند و برخی از آن‌ها در مقابل تجزیه میکروبی بسیار سرسخت هستند. گروه های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها و باکتری‌ها در تجزیه سموم کشاورزی موثرند. باکتری‌هایی از اعضای جنس‌های *Alcaligenes*، *Flavobacterium*، *Pseudomonas* و *Rhodococcus* در متابولیزه کردن آفت‌کش فنیتروتیون نقش دارند. بسیاری از میکروارگانیسم‌های خاک قابلیت تبدیل آفت‌کش فنیتروتیون به ترکیبات غیرسمی را دارند که به این فرایند "تجزیه زیستی"[1] می گویند. در این فرایند هم منبع کربن و هم انرژی از طریق آفت کش فراهم می شود. به نظر می رسد میکروارگانیسم‌ها بهترین گزینه برای متابولیزه کردن سموم کشاورزی و حذف آن‌ها برای بهبود شرایط خاک، کیفیت زندگی در اکوسیستم هستند (۵). محصولات ناشی از هیدرولیز فنیتروتیون به واسطه تجزیه باکتری‌ها شامل: ۹۰ درصد ۳-متیل-۴-نیتروفنل[2] و ۱۰ درصد فنیترواکسون[3] است؛ که فنیترواکسون حتی با این مقدار کم هم برای پستانداران دارای سمیت بالایی است. در شرایط قلیایی فنیترواکسون نیز به ۳-متیل-۴-نیتروفنل تبدیل می‌شود. محصولات نهایی اکسیداتیو ۳-متیل-۴-نیتروفنل، چهار اسید آلیفاتیک کوچک (اسید فرمیک[4]، اسید اگزالیک[5]، اسیدمالئیک[6]، اسید متیل مالئیک[7]) است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد حداکثر اکسیداتیو فنیتروتیون در اسیدیته ۸ تا ۱۲ رخ می‌دهد(۱ و ۶).



شکل۱- مسیر تجزیه فنیتروتیون

هدف از این تحقیق، بررسی وجود باکتری‌های تجزیه کننده سم کشاورزی فنیتروتیون در باغات پسته استان کرمان و سپس، سنجش قابلیت تجزیه زیستی آن برای حذف سم کشاورزی فنیتروتیون است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مناطق آلوده به سموم کشاورزی برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده

نمونه‌برداری در دو فصل زمستان و بهار در شرایط استریل از باغ‌های پسته انجام شد. با استفاده از دستکش استریل لایه رویی خاک (کاه و کلش) کنار زده شد، سپس از عمق صفر تا ۱۰ سانتی‌متری خاک نمونه برداری شد. نونه‌ها داخل کیسه پلاستیکی استریل ریخته، درب پاکت به خوبی بسته شدند و تا زمان رسیدن به آزمایشگاه، در یخچال(درجه سانتی گراد۴) قرار گرفتند. مناطق نمونه برداری همراه با شماره آن‌ها در جدول شماره(۱) نشان داده شده است.

جدول۱- مناطق نمونه‌برداری همراه با اسم اختصاری

شماره نمونه‌برداری	مناطق نمونه برداری
S_1	خاک باغ پسته مرکز آموزش جهاد کشاورزی
S_2	خاک باغ پسته(اسلام آباد) رفسنجان
S_3	خاک باغ پسته (تلمبه حسین آباد) رباط
S_4	خاک باغ پسته (هرمز آباد) رفسنجان
S_5	خاک باغ پسته (کبوترخان) رفسنجان
S_6	خاک باغ پسته (نوق)، شماره ۱، رفسنجان
S_7	خاک باغ پسته (نوق)، شماره۲، رفسنجان
S_8	خاک باغ پسته(داوران) زرند
S_9	خاک باغ پسته(چترود) کرمان
S_{10}	خاک باغ پسته، شماره ۳، رفسنجان

محیط‌های کشت مورد استفاده

- محیط نوترینت-آگار بر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده تهیه شد.
- محیط پلیت کانت- آگار بر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده تهیه شد.
- محیط بوشنل-هاس[8]براث و آگار با ترکیب :

پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات[۹] (۱گرم)، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات[۱۰] (۱گرم)، دی آمونیوم سولفات[۱۱] (۱گرم)، سولفات منیزیم[۱۲] (۰/۴ گرم)، کلرید آهن[۱۳] III (۰/۰۰۴ گرم)، کلرید کلسیم[۱۴] (۰/۰۲ گرم) در هر لیتر محیط و اسیدیته محیط۷ است. پس از همگن کردن محیط، در دمای درجه سانتی‌گراد ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. برای تهیه محیط بوشنل- هاس، آگار با غلظت ۱۵ درصد اضافه شد. تنها منبع کربن این محیط سم آلی کشاورزی فنیتروتیون است. محیط بوشنل- هاس یا MSM باید در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد و دور از نور مستقیم نگهداری شود(۷)

شمارش جمعیت باکتری‌های هتروتروف خاک

شمارش، پس از نمونه برداری در حداقل زمان ممکن انجام شد. رقت‌های سریال ده تایی تهیه و به روش پلیت کانت شمارش شد. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای درجه سانتی‌گراد ۳۰ گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، رقت‌های مختلف حاوی ۲۰ تا ۲۰۰ کلونی، توسط کلونی کانتر، شمارش و با استفاده از رابطه۱ تعداد باکتری‌ها گزارش شد.

تعداد کلونی در هر میلی‌لیتر[۱۵] = میانگین تعداد کلونی در سه پلیت × عکس ضریب رقت×۱۰ =رابطه (۱)

جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سم کشاورزی فنیتروتیون

برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سم کشاورزی فنیتروتیون از محیط بوشنل- هاس (BH) براث استریل با اضافه کردن غلظتی از سم که در نهایت غلظت آن معادل ۵۰ ppm باشد، استفاده شد. از نمونه‌های خاک ۵ گرم به ۱۰۰سی‌سی از این محیط برای غنی‌سازی اولیه تلقیح شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای ممانعت از تجزیه نوری سم ارلن‌ها با ورقه آلومینیم پوشانده شد. پس از گذشت ۱۲ روز از این محیط برداشته شد و به محیط جدید BH انتقال یافت. این کار تا ۳ پاساژ ادامه یافت. از آخرین پاساژ میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت نوترینت آگار به روش کشت چمنی[۱۶] کشت داده شد. سپس با روش کشت خطی، کلونی‌های حاصل از کشت چمنی برداشت شده و به شکل کشت خالص بر روی محیط نوترینت آگار جدید کشت داده شده است. در نهایت برای بررسی قدرت رشد بر روی محیط بوشنل –هاس آگار به روش خطی[۱۷] کشت داده شدند(۷).

غربال‌گری بهترین سویه‌های تجزیه کننده سم فنیتروتیون

برای غربال‌گری بهترین سویه‌های تجزیه‌کننده سم از محیط بوشنل- هاس براث حاوی ۵۰ ppm فنیتروتیون استفاده شد. پس از گذشت۱۲ روز، کلونی‌های باکتری‌ها در رقت‌های یکسانی از سم شمارش و بهترین سویه با توجه به بیش‌ترین تعدادکلونی‌ها انتخاب و غربال‌گری شد.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف فنیتروتیون بر روی رشد باکتری‌های برتر

پس از غربال‌گری سویه برتر تجزیه‌کننده سم، اثر ۶ غلظت مختلف شامل: (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۱۷۰ ppm) بر روی میزان رشد این باکتری بررسی شد. برای جلوگیری از تجزیه نوری سموم ارلن‌ها با ورقه آلومینیم پوشانده شد. پس از گذشت ۱۲ روز برای فنیتروتیون، یک میلی‌لیتر از این محیط برداشته با مقایسه رقت‌های مختلف نمودار رشد بر حسب غلظت سم با توجه به تعداد کلونی‌ها رسم شد.

شناسایی باکتری‌های جداسازی شده

روش‌های بیوشیمیایی

رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های TSI، سیمون سیترات، SIM، اکسایش، تخمیر قندها (OF)، هیدرولیز اوره، اکسیداز، کاتالاز، MR-VP، استفاده از نشاسته برای شناسایی اولیه باکتری‌های جداسازی شده استفاده شد(۸).

شناسایی مولکولی باکتری‌های برتر تجزیه‌کننده سم فنیتروتیون

کلونی‌های غربال‌گری شده با روش مولکولی دقیق‌تر شناسایی شدند. بدین منظور، ابتدا استخراج DNA از باکتری‌ها با استفاده از کیت شرکت کیاژن طبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن *16S rDNA* انجام شد. توالی این پرایمرها عبارت است از:

پرایمر برگشتی:

Uni_1492R 5'- TACGYTACCTTGTTACGACTT-3'

و پرایمر رفت:

Bac27_F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد (۹). غلظت مواد مصرف شده در PCR شامل: بافر PCR (۲۰میلی‌مول Tris، ۵۰ میلی‌مول KCl و ۲ میلی‌مول $MgCl_2$، پرایمر رفتی و برگشتی(۱۲ پیکومول آنزیم Taq U 1، ۲۰۰ میکرومولdNTP) و DNA الگو میزان ۳۰ نانوگرم بود. برنامه PCR شامل: دمای دناتوراسیون اولیه۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ است. محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس باند ۱۴۰۰bp از ژل آگاروز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد(۱۰). نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی بلاست[۱۸] و همولوژی آن‌ها بررسی شد. قرابت بالاتر از ۹۸ درصد به‌عنوان جنس و گونه باکتری مجهول در نظر گرفته شد شد (۱۱).

سنجش میزان تجزیه سموم کشاورزی (فنیتروتیون) با روش کروماتوگرافی گازی (GC)[۱۹]

۱۰۰میلی‌لیترمحیط بوشنل‌هاس براث استریل با غلظت ppm ۵۰ سم تهیه شد. به هر ارلن ۰/۵سی‌سی از باکتری با غلظت نیم مک‌فارلند اضافه و داخل انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ روز قرار داده شد. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط داخل ارلن را برداشته و با آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس دو بار، هر بار به مدت نیم ساعت با ۲۰میلی‌لیتر، n- هگزان بر روی شیکر قرار داده شد. پس از آن، با استفاده از قیف جداکننده فاز آلی را از فاز آبی جدا شده و ماده استخراج شده با استفاده از سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری شد. با استفاده از روتاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، آن را خشک کرده و با ۵ میلی‌لیتر استون به حجم رسانده شد. سپس، توسط دستگاه GC[۲۰] با دتکتور FID، ستون Hp-5[۲۱]، گاز حامل هیدروژن، گاز جبران کننده نیتروژن، دمای اولیه ستون ۶۰ درجه سانتی‌گراد در ۱ دقیقه، دمای نهایی ستون ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد، دمای تزریق ۲۵۰درجه سانتی‌گراد و دمای دتکتور ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد تحلیل شد(۷ و ۹).

نتایج

نتایج حاصل از شمارش جمعیت باکتری‌های هتروتروف خاک در دو فصل

شمارش باکتری‌های هتروتروف در نمونه‌های خاک آلوده به سم کشاورزی فنیتروتیون، در محیط پلیت کانت آگار در دو فصل بهار و زمستان انجام شد. نتایج حاصل از این شمارش در جدول(۲) آمده است. همان‌طور که انتظار می‌رفت جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده در همه نمونه‌ها در فصل بهار نسبت به فصل زمستان بیشتر است که می‌تواند دلیل آن کاربرد بیشتر سموم در فصل بهار باشد.

جدول۲- شمارش جمعیت باکتری‌های هتروتروف در نمونه‌های خاک باغات پسته در (CFU/ml)

نام نمونه	تعداد باکتری‌های هتروتروف در بهار	تعداد باکتری‌های هتروتروف در زمستان
S_1	۲۱۵×۱۰^{۵}	۳۸×۱۰^{۵}
S_2	۳۰×۱۰^{۶}	۱۲×۱۰^{۶}
S_3	۱۷۹×۱۰^{۵}	۲۱×۱۰^{۵}
S_4	۹۵×۱۰^{۴}	۲۵×۱۰^{۴}
S_5	۲۰۲×۱۰^{۴}	۵۴×۱۰^{۴}
S_6	۱۶۵×۱۰^{۴}	۲۰×۱۰^{۴}
S_7	۱۳۰×۱۰^{۴}	۲۲×۱۰^{۴}
S_8	۹۷×۱۰^{۵}	۲۲×۱۰^{۵}
S_9	۹۸×۱۰^{۵}	۲۰×۱۰^{۵}
S_{10}	۳۸×۱۰^{۵}	۱۰×۱۰^{۵}

نتایج حاصل از شمارش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده سم فنیتروتیون در نمونه‌های خاک

نتایج حاصل از شمارش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده در جدول (۳) آمده است. همان گونه که در جدول مشاهده می‌شود. بیش‌ترین جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده برای سم فنیتروتیون به نمونه S_7 مربوط است.

جدول۳- نتایج حاصل از شمارش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده سم

نام نمونه	وجود تجزیه‌کننده فنیتروتیون
S_1	۸۶×۱۰^{۴}
S_2	۴۰×۱۰^{۴}
S_3	۱۶۰×۱۰^{۵}
S_4	–
S_5	–
S_6	–
S_7	۲۰۳×۱۰^{۴}
S_8	۲۲×۱۰^{۴}
S_9	–
S_{10}	–

نتایج حاصل از بررسی توانایی رشد باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های خاک در محیط بوشنل-هاس آگار

همه باکتری‌های جداسازی شده و خالص شده توانایی رشد روی محیط بوشنل-هاس آگار را نداشتند. کلونی‌های باکتری‌های تجزیه‌کننده فنیتروتیون در مدت ۳ تا ۴ روز، روی محیط بوشنل-هاس آگار نمودار شدند. نتایج حاصل از این آزمایش در جدول (۴) آمده است. همان‌طور که در جدول دیده می‌شود در نمونه‌های خاک S_4، S_5، S_6، S_9 و S_{10} باکتری تجزیه کننده‌ای برای فنیتروتیون شناسایی نشد.

جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سموم: ویژگی‌های باکتری‌ها

در طی این تحقیق ۵ سویه باکتریایی تجزیه‌کننده فنیتروتیون از نمونه‌های خاک باغ‌های پسته در استان کرمان با حداقل فاصله ۱۸ کیلومتری از یکدیگر جداسازی شدند که در جدول(۴) برخی از ویژگی‌های باکتری‌ها آمده است.

جدول۴- باکتری‌های جداسازی شده تجزیه کننده فنیتروتیون و ویژگی‌های آن‌ها

نام سویه	شکل باکتری و واکنش گرم	ویژگی‌های کلونی	TSI	سیمون سیترات	اکسیداز	کاتالاز	SIM	اوره‌آز	MR	O/F	ژلاتیناز	استفاده از نشاسته
F1	باسیل گرم منفی	گرد و محدب، موکوییدی لبه صاف به قطر mm1-2	Alk/Al K بدون گاز و H_2S	+	+	+	−−−	−	+	+/−	+	−
F2	دیپلوباسیل گرم منفی	گرد و محدب به قطر mm1-2	A/A با گاز بدون H_2S	+	−	+	−−+	−	+	+/+	−	−
F3	دیپلوباسیل گرم مثبت	گرد و محدب خشن	A/A با گاز بدون H_2S	+	−	+	−−+	−	−	+/+	−	−
F4	باسیل گرم منفی	پیگمان‌دار به رنگ سبز- آبی	Alk/Al K بدون گاز و H_2S	+	+	+	−−−	−	+	+/−	+	−
F5	باسیل گرم منفی	گرد و محدب موکوییدی	A/A بدون گاز و H_2S	+	−	+	−−+	−	+	+/+	−	−

انتخاب سویه‌های برتر از طریق بررسی ویژگی‌های باکتری‌ها و CFU

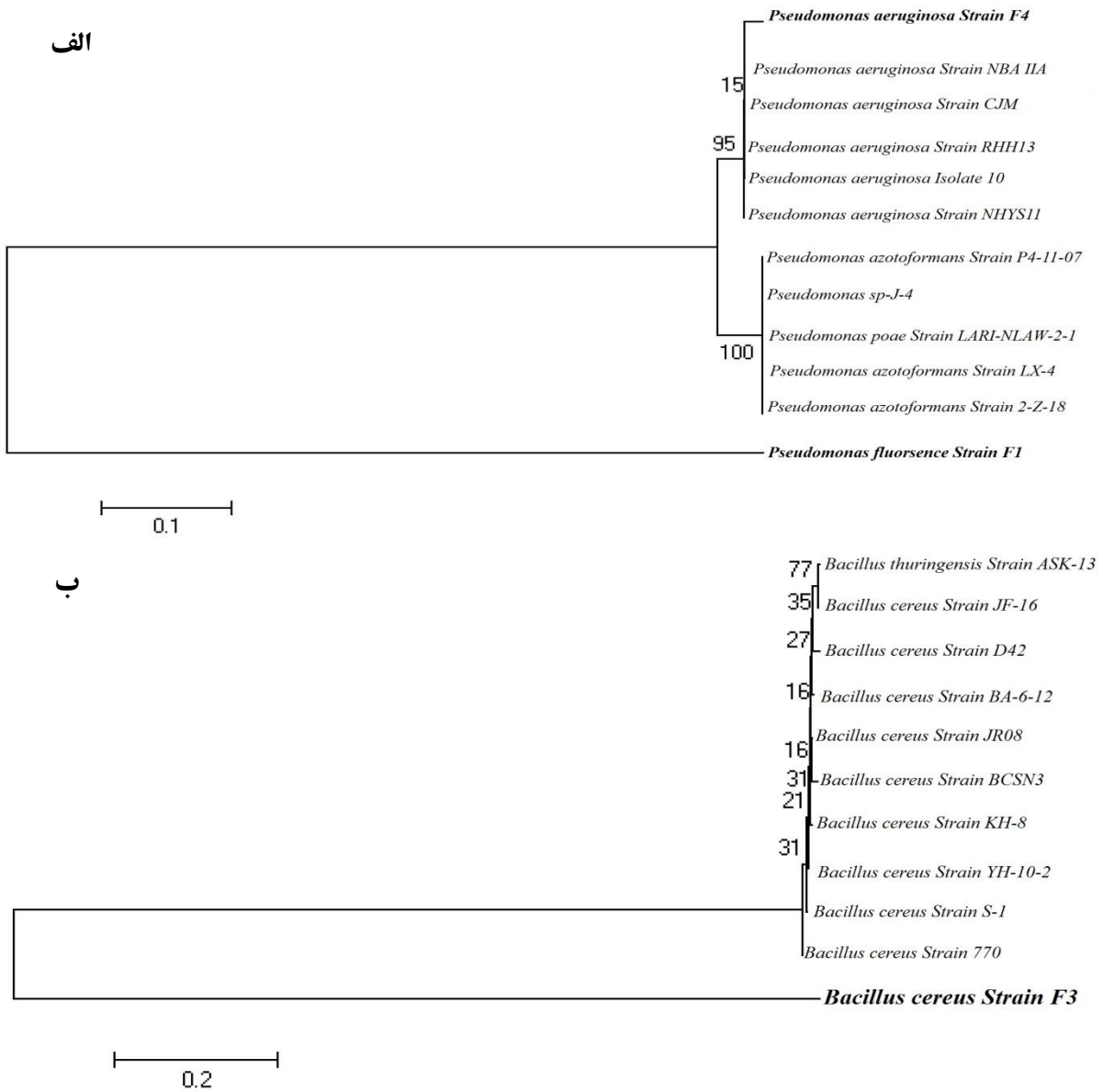
با توجه به صفات رشدی باکتری‌های جداسازی شده در محیط حاوی سم آلی کشاورزی (فنیتروتیون) به عنوان تنها منبع کربن برخی از سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، که رشد پایینی در این شرایط داشتند، حذف شدند. معیار دیگر غربال‌گری برای انتخاب سویه‌های برتر در تجزیه سموم آلی شباهت‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک سویه‌های باکتریایی نزدیک به هم بود. در مجموع در چند مرحله غربال‌گری سویه‌های F1، F3، F4 برای مراحل بعدی کار انتخاب شدند. در نتیجه از ۵ سویه جداسازی شده ۳ سویه به عنوان سویه برتر انتخاب شدند.

شناسایی مولکولی سویه‌های برتر تجزیه کننده سم آلی فنیتروتیون

شناسایی مولکولی باکتری‌های قوی در تجزیه سموم آلی کشاورزی با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی *16S rRNA* با پرایمرهای ویژه این ژن (F,1492R۲۷) انجام شد. سپس محصول bp ۱۴۰۰ حاصل از PCR از ژل استخراج، خالص‌سازی و تعیین توالی شد. توالی به دست آمده در بانک‌های ژنی بلاست شد و بالاترین همولوژی (بالاتر از ۹۸ درصد) به عنوان جنس و گونه‌ی باکتری تعیین شد. توالی به دست آمده و بالاترین همسانی پس از بلاست کردن توالی به‌دست آمده، در بانک‌های ژنی به همراه شماره دستیابی توالی این سویه در پایگاه EMBL به شکل جداگانه برای هر سویه در جدول (۵) آمده است. فیلوژنی و نزدیکی این سه سویه در شکل (۲) آمده است.

جدول۵- شناسایی مولکولی سویه‌های جداسازی شده

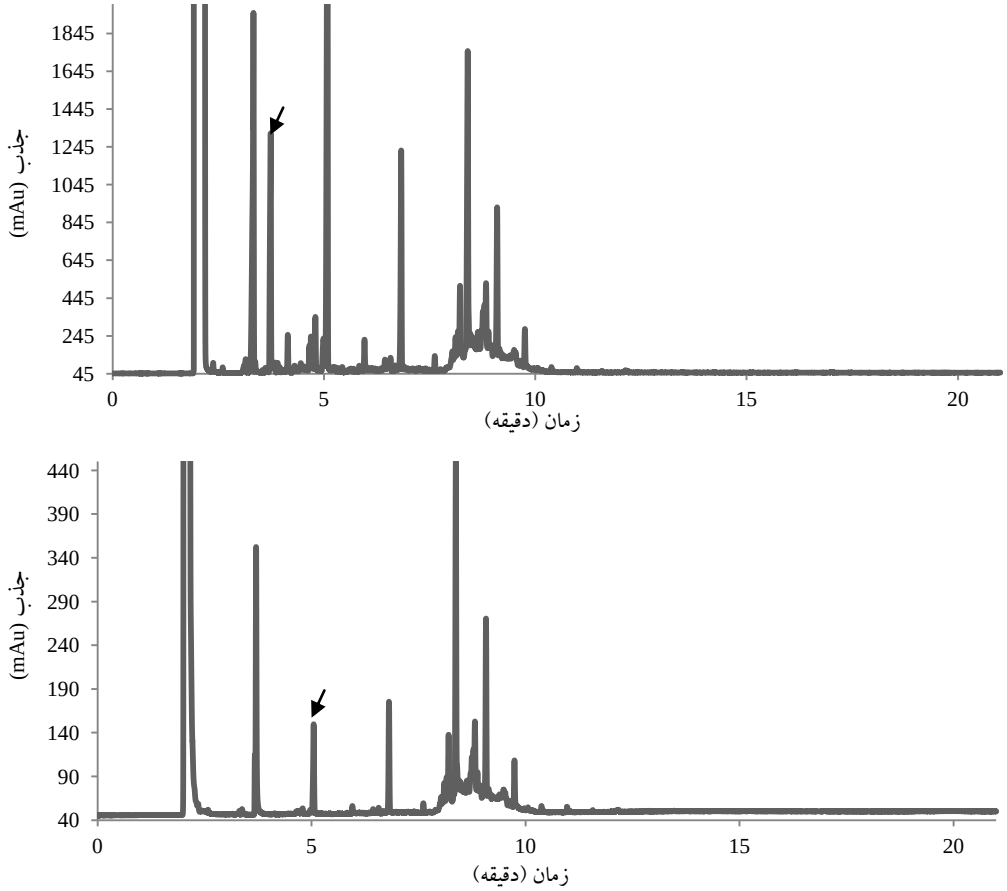
نام سویه	شناسایی سویه	شماره دستیابی	درصد شباهت
F1	*Pseudomonas fluorescens*	HF572853	۹۹
F3	*Bacillus cereus*	*HF572847*	۹۸
F4	*Pseudomonas aeruginosa*	*HF572851*	۹۹



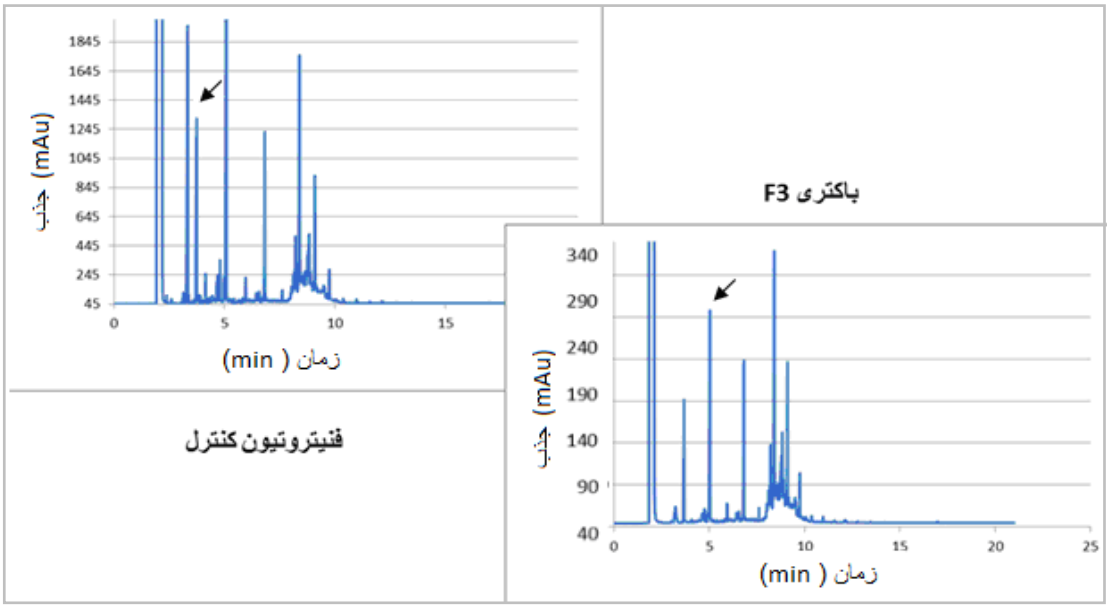
شکل۲- درخت فیلوژنی سویه‌های شناسایی شده الف) سودوموناس ب) باسیلوس. درخت فیلوِنی با نرم افزار MEGA 5 و با روش Neighbor Joining رسم شده است.

بررسی میزان تجزیه با مقایسه نتایج به‌دست آمده از گازکروماتوگرافی

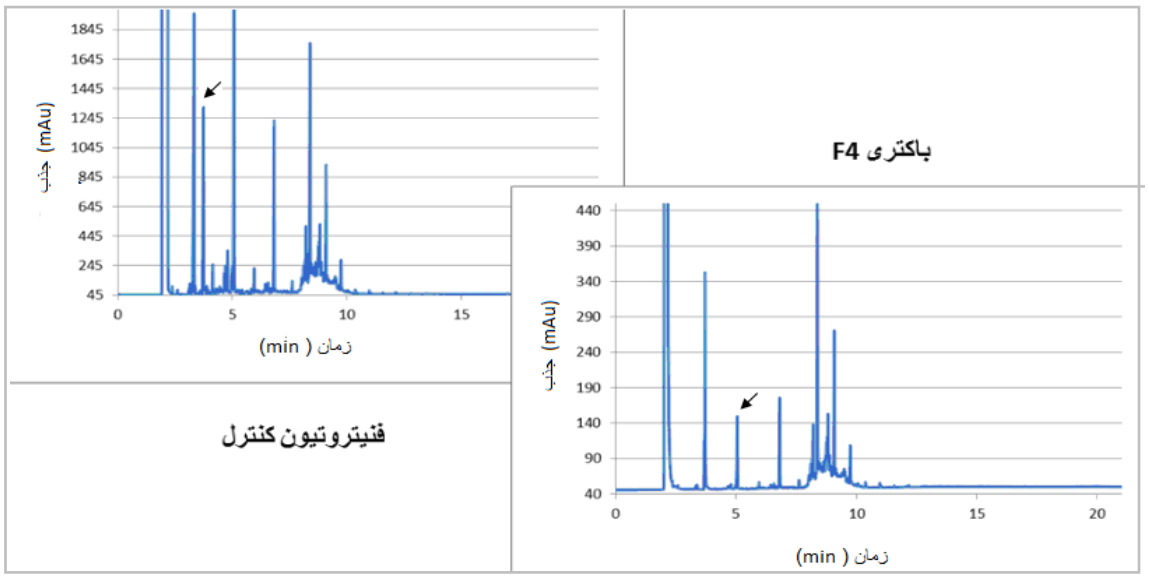
در شکل ۳ پیک‌ها به سم فنیتروتیون و باکتری تجزیه کننده فنیتروتیون F1 باغلظت ۵۰ ppm مربوط است که تمامی مراحل استخراج روی آن انجام شده است. شکل ۴ نیز مقایسه تجزیه فنیتروتیون کنترل را با تجزیه توسط سویه‌های F3 و F4 نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودارها دیده می‌شود پیک مربوط به سم فنیتروتیون در همه باکتری‌های تجزیه کننده در مقایسه با شاهد کاهش در خور توجهی داشته است. اما این کاهش پیک در هر سه باکتری جداسازی شده به یک میزان نبوده است. بیش‌ترین میزان کاهش پیک سم فنیتروتیون مربوط به باکتری F4 است در مجموع نتایج به دست آمده از گاز کروماتوگرافی تایید کننده تجزیه سم فنیتروتیون هستند.



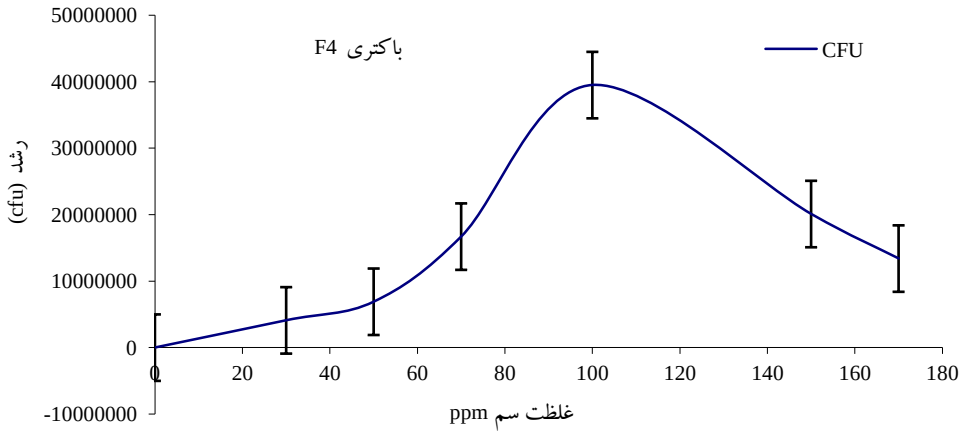
شکل ۳- نمودار فنیتروتیون کنترل(میزان تجزیه سم فنیتروتیون باغلظت ۵۰ ppm، بدون حضور باکتری می‌باشد که تمامی مراحل استخراج روی آن انجام شده است.) و تجزیه فنیتروتیون توسط باکتری F1(میزان تجزیه سم فنیتروتیون باغلظت ۵۰ ppm، باحضور باکتری *Pseudomonas fluorescens* است که تمامی مراحل استخراج روی آن انجام شده است). علامت فلش به پیک فنیتروتیون مربوط است.



شکل ۴- نمودار تجزیه فنیتروتیون توسط باکتری F3 و باکتری F4 (تجزیه سم فنیتروتیون باغلظت ۵۰ppm، باحضور باکتری *Bacillus cereus* و *Pseudomonas aeruginosa* است که تمامی مراحل استخراج روی آن انجام شده است). علامت فلش به پیک فنیتروتیون مربوط است.



شکل۴- ادامه



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف سم فنیتروتیون بر رشد سویه برتر **F4** (*Pseudomonas aeruginosa*)

اثر غلظت‌های مختلف سموم آلی کشاورزی بر رشد باکتری‌های برتر تجزیه کننده

تاثیر غلظت‌های مختلف سم آلی فنیتروتیون بر رشد باکتری‌های تجزیه کننده که غربال‌گری شده بودند، با کشت این باکتری‌ها در غلظت‌های فزاینده سموم آلی از ۳۰ppm- ۱۷۰ انجام شد. نتایج برای این سم در شکل ۵ نشان داده می‌شود. برترین سویه تجزیه‌کننده فنیتروتیون F4 که در این پژوهش *Pseudomonas aeruginosa* شناسایی شده است. تا غلظت ۱۰۰ ppm افزایش رشد داشته است و پس از آن در غلظت‌های بالاتر رشد کاهش می‌یابد.

میزان تجزیه هر یک از سموم

با محاسبه سطح زیر منحنی و مقایسه با شاهد میزان تجزیه‌پذیری سم توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده آن محاسبه شد که در جدول۶ آمده است.

جدول۶- میزان تجزیه سم فنیتروتیون توسط باکتری‌های غربال شده

میزان تجزیه (درصد)	نام باکتری	بازده استخراج حلال (درصد)
۸۲	F_1	۷۰
۲۰	F_3	۵۴
۸۵	F_4	۷۸

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون باکتری‌های تجزیه‌کننده سموم آلی کشاورزی توسط پژوهشگران در محیط‌های مختلف و اکوسیستم‌های خاکی متفاوت بررسی شده‌اند. باکتری‌ها از جنس‌های مختلف قادر به تجزیه سموم آلی کشاورزی هستند. گستردگی استفاده از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در سراسر جهان، افزایش آگاهی از ماندگاری و سمیت آن‌ها و اثرات جبران ناپذیرشان بر انسان و اکوسیستم‌های مختلف زمین، تجزیه میکروبی این حشره‌کش‌ها را بیشتر مورد توجه قرار داده است. در سال ۱۹۷۳ تجزیه زیستی آفت‌کش‌های ارگانوفسفره توسط گیاهان، خاک‌ها و حیوانات توسط بینون[۲۲] و همکاران گزارش شد (۱۲ و ۱۳). در سال ۱۹۷۹ روزنبرگ[۲۳] و آلکساندر[۲۴] شکافت میکروبی[۲۵] را عامل اصلی تجزیه حشره‌کش‌های ارگانوفسفره دانستند (۵). در سال ۲۰۰۱ ببهید[۲۶] با بررسی گسترده تجزیه میکروبی در ۱۰ نمونه خاک در هند توانست از خاک‌هایی که مدت زمان زیادی در معرض حشره‌کش‌های ارگانوفسفره بودند ۲۲ سویه باکتری متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Arthrobacter*، *Pseudomonas*، *Planococcus* و *Stomatocucus* جداسازی کند (۱۰). در سال ۲۰۰۲ دشپند[۲۷] از خاک‌های سیلابی، کود حیوانی گاو و لجن فعال صنعتی ۲۶ سویه باکتری تجزیه‌کننده‌ی حشره‌کش ارگانوفسفره دایمتوات[۲۸] جدا کرد که با تعیین توالی *16S rRNA* متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Klebsiella* و *Brevundimonas* بودند (۱۰). در سال ۲۰۰۳ کانکار[۲۹] و همکاران با بررسی خاک‌های کشاورزی هند که مدت زیادی از این سموم کشاورزی استفاده می‌کردند، برای سم‌های مختلفی از این گروه آفت‌کش باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ای از جنس‌های مختلف *Pseudomonas sp.* و *Flavobacterium sp.* را شناسایی کردند؛ ژنتیک و مسیرهای آنزیمی نیز در آن‌ها بررسی شد (۱۱ و ۱۴). در این تحقیق، باکتری‌های تجزیه‌کننده سم آلی متداول کشاورزی فنیتروتیون از اکوسیستم‌های خاک کشاورزی (باغ‌های پسته) آلوده به سموم به عنوان منبع جداسازی به کاربرده شد. در واقع این خاک‌ها، مدت زمان طولانی در معرض این نوع آلاینده‌ها بوده‌اند. اکوسیستم انتخاب شده در این پژوهش با اکوسیستم‌های انتخابی توسط بسیاری از پژوهشگران هم‌خوانی دارد، زیرا طبق اصل تطابق باکتری‌های تجزیه‌کننده یک آلاینده در مکان‌هایی یافت می‌شود که در تماس با آلاینده باشد. در این پژوهش از همین اصل برای دستیابی به باکتری‌ها استفاده شد. در این پژوهش، تعداد ۵ باکتری تجزیه کننده سم، برای سم فنیتروتیون، جداسازی شد. پس از غربال‌گری ۳ سویه برتر که می‌توانستند رشد بالاتری در این سموم از خود نشان دهند انتخاب شدند. سویه‌های باکتریایی تجزیه کننده سم آلی فنیتروتیون شناسایی شدند، این ۳ سویه شامل: باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens strain F1*، *Bacillus cereus strain F3* و *Pseudomonas aeruginosa strain F4* هستند. افزایش غلظت سم فنیتروتیون بر باکتری برتر شناسایی شده تا غلظت ppm ۱۰۰ باعث افزایش رشد آن می‌شود. این نتیجه را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که این باکتری تا غلظت مشخص ppm ۱۰۰ دارای تطابق نسبت به تجزیه است و از سم به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کند و غلظت بالاتر از ppm ۱۰۰ برای این باکتری سمی است.

تاکنون روش‌های مختلفی برای بررسی میزان تجزیه زیستی سموم کشاورزی بکار رفته است. از این روش‌ها

می‌توان به زیست‌سنجی[۳۰]، کروماتوگرافی لایه نازک[۳۱]، کروماتوگرفی گازی، کروماتوگرفی گاز و مایع –طیف جرمی[۳۲] اشاره کرد (۱ و ۱۲).

کیکن[۳۳] و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی با دتکتور TSD[۳۴] میزان تجزیه سم دیازینون توسط سویه‌ها *Serratia Pseudomonas* را بررسی و تایید کردند (۱۱). در سال ۲۰۱۰ ابوعامر[۳۵] و همکاران با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی میزان تجزیه دیازینون توسط *Serratia marcescens* را بررسی کردند (۷ و ۱۴). در این تحقیق از روش گاز کروماتوگرافی با دتکتور FID برای بررسی میزان تجزیه پذیری سموم بکار رفته استفاده شد. نتایج به دست آمده از GC نشان داد که برخی از سویه‌ها کاهش فوق‌العاده‌ای در پیک‌های به دست آمده دارند و برخی نیز میزان تجزیه‌پذیری آن‌ها متوسط و ضعیف است. نتایج به دست آمده از GC با نتایج به‌دست آمده از رشد باکتری‌ها در سموم همخوانی دارد.

References

(1) Singh B , Walker A, Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev*. 2006; 30(3): 428–71.

(2) Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). The reconsideration of approvals of the active constituent fenitrothion, registrations of products containing fenitrothion and their associated labels 2004; 9-50.

(3) Environmental Protection Agency. US EPA, Office of Pesticide Programs, Registration Div. , Washington, DC. 1987*; Pesticide Fact Sheet Number14* .

(4) Mehrnejad M, The current status of pistachio pests in Iran. *CIHEAM* 2001; 56: 315- 22.

(5) Rosenberg A, Alexander, M. Microbial cleavage of various Organophosphorus insecticides. *Apple Environ. Microbiol* 1979; 37(5): 886-91.

(6) Robert TR, Hutson D. *Metabolic Pathways of Agrochemicals*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 1999.

(7) Abo A, Aly E. Biodegradation of Diazinon by Serratia marcescens DI101 & its use in bioremediation of contaminated Environment . *J. Microbial Biotecnol* 2011; 21(1): 71-80.

(8) Willams S. T, Sharpe M. E, Holt J. G. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1-6 .New York: Springer-Verlag; 1989.

(9) Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S, Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Mar. Pollut. Bull*. 2012; 64(1); 7-12.

(10) Smartbook J, Rusell D. Molecular cloning III: A laboratory manual cold spring harbor laboratory. 53rd. New York: Springer; 2011.

(11) Cycoń M, Wójcik M, Piotrowska-Seget Z. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere*. 2009; 76(4): 494-501.

(12) Yakimov M. M, Cappello S, Crisafi E, Tursi A. Phylogenetic survey of metabolically active microbial communities associated with the deep-sea coral Lophelia pertusa from the Apulian Plateau, Central Mediterranean Sea. *Deep Sea Res*. Part I. 2006; 53, 62-75.

(13) Beynon K, Hutson D, Wright. A. The metabolism & degradation of Vinyl phosphate insecticides; *Res. Rev*. 1973; (47): 55-142.

(14) .Kanekar. P, Bhadbhade. B, Deshpande N, Sanaik S. , Biodegreadtion of Organophosphorus Pseticides, *Proc. Indian natn Sci Acad*. 2004; 70(1): 57-70.

[1]- Biodegradation
[2]- 3-methyl-4-nitrophenole
[3]- fenitrooxon
[4]- Formic acid
[5]- Oxalic acid
[6]- Maleic acid
[7]- Methyl maleic acid
[8]- Bushnell- Hass
[9]- KH_2Po_4
[10]- K_2HPo_4
[11]- $[NH4]_2SO_4$
[12]- $MgSO_4$
[13]- FeCl(III)
[14]- $CaCl_2$
[15]- Colony Forming Unit
[16]- Spread culture
[17]- Streak culture
[18]- Blast
[19]- Gas Chromatography
[20]- Germany(Agillent6890)
[21]- ۰/۲۵ میکرومتر×۰/۳۲ میلی‌متر×– ۳۰ متر
[22]- Beynon
[23]- Rosenberg
[24]- Alexander
[25]- Microbial cleavage
[26]- Bhadbade
[27]- Deshpande
[28]- Dimethoate
[29]- Kanekar
[30]- Bioassay
[31]- Thin-Layer chromatography
[32]- GC-Mass
[33]- Cycoń
[34]- Thermionic Specified Detector
[35]- Abo Amer

Isolation and characterization of Fenitrothion-degrading bacteria from pestachio gardens in Kerman Provinance

Mehrnoush Ghafari *
M.Sc. of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Arak , Iran, mehrnoushghafari@gmail.com
Mehdi Hasanshahian
Assistant Professor of Microbiology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, m_hsn2002@yahoo.com
Mohamad Mahani
Assistant Professor of Analytical Chemistry, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, mohmahani@gmail.com

Abstract

Introduction: Pesticides with complex structure have high persistence in ecosystem and biosphere. Pesticides have harmful effects on farmlands, human and natural resources.

Materials and methods: In this study for isolation of pesticide-degrading bacteria (Fenitrothion) soil samples were collected from pistachio gardens in Kerman province. Collected soil samples were enriched in Bushnell Hass medium with this pesticide as only carbon and energy source. Isolated bacteria were identified by amplification of 16S rDNA gene by PCR and sequencing.

Results: In this study three Fenitrothion -degrading bacterial strains were isolated. These isolated bacteria were identified as: *Pseudomonas fluorescens strain F1* ،*Bacillus cereus strain F3 and pseudomonas aeruginosa strain F4*. The effects of pesticides concentration on each dominant bacterial strain were investigated. For Fenitrothion degrading bacterium (F4 strain) growth continue until 100 ppm and then decreased. The result of Gas Chromatography (GC) analysis confirmed the biodegradation ability of selected bacterial strains.

Discussion and conclusion: The results of this study demonstrated that there is a diversity of pesticide-degrading bacteria (Fenitrothion) in soil ecosystem farmlands of Kerman province. It is seemed by application of these pesticide-degrading bacteria in farmlands and using bioremediation technique the ecosystem contamination of pesticide can be decreased.

Key words: Soil contamination, *Pseudomonas*, Biodegradation, Fenitrothion, Kerman

* Corresponding author
Received: July 31, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013