

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

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°C, 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

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.rafiyan@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 به شکل گسترده در کشاورزی استفاده و درصد زیادی از آنها به محیط‌زیست رها می‌شوند و آثار مضر 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 کم‌آبی، 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 کلریپریفوس 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 کلریپریفوس 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 کلریپریفوس 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 کلریپریفوس (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 کلریپریفوس 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، کلریپریفوس، پاکسازی زیستی، کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی

* نویسنده مسؤول مکاتبات، آزمایشگاه اکسترموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس

علوم، دانشگاه تهران، ایران

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 زئوئوتیک^۱، مشکلات زیست‌محیطی فراوانی از جمله 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 آلوده کردن 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 به‌طور گسترده 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 گلوبول 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 - (3,5,6-trichloro-O,O-diethyl O-(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 آفت‌خانگی 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

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی و جداسازی: ۳ نمونه خاک کشاورزی، ۱ نمونه آب کشاورزی و ۱ نمونه پساب کارخانه تولیدکننده آفت کش برای غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌ها استفاده شدند. ابتدا ویژگی‌های نمونه‌ها شامل هدایت الکتریکی، میزان نمک‌های محلول، شوری و اسیدیته با دستگاه هفت کاره 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 فیننگ و لیپرت^۳ (۱۷) انجام شد. کلریپریفوس تکنیکال با خلوص ۹۶/۸ درصد از شرکت تولید آفت‌کش گیاه^۴ تهیه و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلریپریفوس به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. ترکیب محیط کشت M9 اصلاح‌شده شامل ۵۰ گرم NaCl، ۱ گرم KH_2PO_4 ، ۱ گرم K_2HPO_4 ، ۱ گرم MgSO_4 یک مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر CaCl_2 یک مولار در لیتر بود. ترکیب محلول ریزمغذی فیننگ و لیپرت برای تقویت رشد، عبارت بود از: ۵۰۰ میلی‌گرم $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۲۰۰ میلی‌گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۰ میلی‌گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۳ میلی‌گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۲۰ میلی‌گرم $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۳۰ میلی‌گرم H_3BO_4 ، ۲ میلی‌گرم $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ و ۳ میلی‌گرم $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ در ۱۰۰ میلی‌لیتر. اسیدیته محیط کشت 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.

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

جدایه‌ها با چندین مرحله تجدید کشت روی محیط جامد انجام شد. از واکنش رنگ آمیزی گرم برای تأیید خلوص کلنی‌ها و تعیین شکل میکروسکوپی هریک از آنها و از آزمون KOH ۳ درصد (وزنی/حجمی) برای تأیید نتایج رنگ آمیزی 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 شیکرانکوباتور 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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 رشد کردن یا

برای جلوگیری از رسوب، استوک‌های ۱ مولار کلرید کلسیم و منیزم سولفات جداگانه تهیه، استریل و به محیط کشت تهیه‌شده اضافه شدند. استوک کلرپیریفوس با استفاده از نمونه تکنیکال به شکل محلول در استون و با در نظر گرفتن درصد خلوص ۹۶/۸ تهیه و به اندازه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پس از اتوکلاوشدن محیط کشت به آن اضافه شد. برای اطمینان از تبخیر استون پس از اضافه کردن 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 سپری شدن مدت گرماگذاری، فرایند غنی‌سازی با انتقال ۱ میلی‌لیتر از نمونه به محیط کشت 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، ۰/۳ گرم Sodium Magnesium sulphate، ۰/۳ گرم pyruvate و ۱۵ گرم Dipotassium phosphate 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

محیط یادشده برای یافتن درصد های لازم به نسبت های مختلفی رقیق شد و ۰/۵ درصد عصاره مخمر برای تأمین ماده مغذی به محیط SW اضافه شد. تحمل پذیری نمک یا نمک دوست بودن جدایه ها به ترتیب با رشد کردن یا نکردن آنها در محیط بدون نمک تعیین شد.

شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنتیک سویه

منتخب: برای استخراج DNA باکتری ها از روش اصلاح شده استخراج DNA پیشنهادی مارمور^۵ استفاده شد (۱۹). واکنش زنجیره ای پلیمرز با پرایمرهای عمومی باکتری ها

(5'-AGAGTTTGATCMTGGGTCAG-3') 27F

و

(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 1492R

انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت ۶ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله تکثیر به شکل ۳۰ چرخه تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی گراد (۶۰ ثانیه)، دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی گراد (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 تکثیر شده برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. توالی حاصل با نرم افزار ChromasPro بررسی و سپس توالی آن با توالی های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی EzTaxon مقایسه شد. سپس تحلیل فیلوژنتیک سویه منتخب و سویه های نزدیک به آن با نرم افزارهای Bioedit و Mega6 انجام و درخت فیلوژنتیک مربوط به آنها با روش Neghiborjoining رسم شد (۱۹).

نکردن جدایه ها در هر غلظت آفت کش کلرپیریفوس با گرماگذاری در ۳۴ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته بررسی شد.

میزان رشد جدایه ها در محیط پایه معدنی در حضور ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) بررسی شد. با توجه به رشد بسیار کم جدایه ها و ممکن نبودن استفاده از اندازه گیری جذب نوری (OD) برای بررسی میزان رشد جدایه ها، از روش شمارش تعداد باکتری ها در محیط R2A به اضافه ۵ درصد NaCl استفاده شد. شمارش با تهیه سریال رقت از نمونه و برداشتن و پخش کردن ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف روی محیط جامد و گرماگذاری پلیت ها در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. در نهایت جدایه دارای بیشترین رشد در حضور آفت کش (تنها منبع کربن) برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شد.

برای بررسی ریخت شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه های انتخاب شده در مرحله غربال گری، فعالیت اکسیدازی با استفاده از دیسک های اکسیداز شرکت پادتن طب و فعالیت کاتالازی با استفاده از محلول هیدروژن پراکسید ۳ درصد (حجمی/حجمی) بررسی شد (۱۷).

برای بررسی محدوده نمک لازم برای رشد جدایه ها، از محیط SW با درصد های 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 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ، ۱ گرم $CaCl_2$ ، ۶۱ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۶ گرم KCl، ۰/۲ گرم $NaHCO_3$ و ۰/۷ گرم KBr در لیتر.

بررسی میزان تجزیه با کروماتوگرافی گازی -

طیف‌سنجی جرمی (GC-MS): در پژوهش حاضر از گاز کروماتوگراف 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 سانتی‌گراد با شیب ۵ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد، 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 آفت کش (تنها منبع کربن): از آنجا که رشد باکتری به استفاده از منبع کربن وابسته است، ایجاد شرایط رشدی بهتر برای سویه در حضور آفت کش کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) به تجزیه بهتر این آفت کش 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 اصلاح شده 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

بررسی میزان تجزیه آفت کش توسط سویه منتخب

آماده‌سازی نمونه: برای بررسی میزان تجزیه کلرپیریفوس توسط سویه منتخب، از محیط مایع پایه معدنی M9 اصلاح شده دارای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرپیریفوس (تنها منبع کربن) استفاده شد. گرماگذاری ارلن‌ها در شیکرانکوباتور با فضای تاریک و دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد. برای مقایسه و بررسی میزان تجزیه، نمونه تلقیح نشده‌ای 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

اتیل استات: فسفریک اسید (۳:۹۷)، توصیه شده لاکشمی^۷ و همکاران برای استخراج کلرپیریفوس از محیط مایع استفاده شد (۲۰). مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سیستم حلالی یادشده به محیط مایع اضافه و ۲ ساعت در شیکر ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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، نمونه‌ها به ویال‌های شیشه‌ای منتقل و تا مدت ارسال برای تحلیل در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام مراحل برای نمونه شاهد تلقیح نشده نیز انجام شدند. برای بررسی تأثیر عوامل خارجی از جمله دما یا اکسیداسیون بر میزان آفت کش طی زمان گرماگذاری و مقایسه نمونه شاهد تلقیح نشده با نمونه اولیه، نمونه تکنیکال آفت کش نیز با کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی بررسی شد.

انجام و ۱۴ روز گرماگذاری شد. برای سنجش رشد، هر روز از محیط سریال رقت تهیه و شمارش کلنی به روش قطره ای 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 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ، ۰/۱۸ گرم $CaCl_2$ ، ۴/۸ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۱ گرم KCl، ۰/۰۱۳ گرم NaBr، ۵ گرم Proteose peptone، ۱۰ گرم Yeast extract و ۱۵ گرم Agar در لیتر.

نتایج

جداسازی و غنی سازی: ویژگی های اصلی نمونه های استفاده شده در پژوهش حاضر در جدول ۱ نشان داده شده اند.

پس از سه مرحله غنی سازی ۱۴ روزه، جمعیت میکروبی از هر نمونه جدا و حضور باکتری ها در هر مرحله غنی سازی با رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی پس از مرحله غنی سازی تأیید شد. در کل، ۲۸ جدایه از محیط های غنی سازی، خالص سازی 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 ویژگی های ریخت شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه ها: از تعداد ۲۸ جدایه ای که در حضور ۵۰ mg/l کلرپیریفوس کشت داده شدند، ۱۴ جدایه با توجه به کدورت محیط رشد، مشاهده میکروسکوپی و مشاهده کلنی روی محیط جامد

فارلند و تلقیح به میزان ۳ درصد محیط از کدورت تهیه شده انجام شد و محیط ها 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 قطره ای^۱ (۲۱ و ۲۲) و شمارش تعداد کلنی ها پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد سنجیده شد. در روش قطره ای پس از گذشت زمان گرماگذاری، سریال رقت از همه نمونه ها تهیه و مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر رقت به محیط های 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 سانتی گراد برای بررسی دمای بهینه؛ اسیدیته های ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ برای بررسی اسیدیته بهینه؛ درصد های نمک ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ برای بررسی درصد نمک بهینه و غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ میلی گرم در لیتر از آفت کش برای بررسی غلظت آفت کش بهینه برای رشد بررسی شدند. هر کدام از مراحل جداگانه انجام و در هر یک، تنها فاکتور بررسی شده تغییر داده شد و سایر فاکتورها ثابت در نظر گرفته شدند. در نتیجه، دما به میزان ۳۴ درجه سانتی گراد، اسیدیته به میزان ۷، نمک به اندازه ۵ درصد و غلظت کلرپیریفوس به میزان ۱۰۰ میلی 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 اصلاح شده در شرایط بهینه رشدی تهیه و مشابه مراحل پیش، تلقیح از کشت تازه

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.

برای مرحله بعد انتخاب شدند. در این مرحله با افزایش غلظت آفت کش به ۱۰۰ mg/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 به عنوان جدایه منتخب انتخاب شد. ویژگی‌های کلی و میزان رشد ۵ جدایه دارای بیشترین رشد در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- ویژگی نمونه‌های استفاده‌شده برای جداسازی

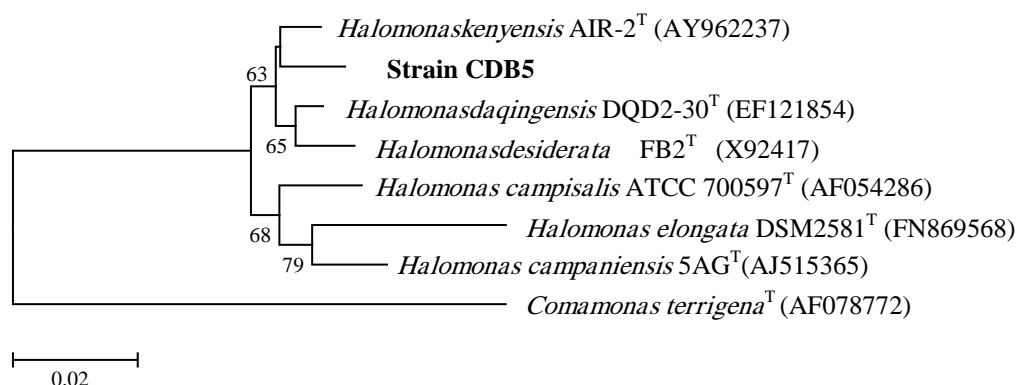
نمونه	هدایت الکتریکی ^{۱۱} (میکروزیمنس/سانتی‌متر) ^{۱۲}	میزان نمک‌های محلول ^{۱۳} (میلی‌گرم/لیتر)	شوری ^{۱۴} (گرم/لیتر)	اسیدیته
خاک کشاورزی ایوانکی	۲۳۴۰۰	۱۱۷۹۰	۱۱/۸	۷/۶
آب مزرعه نیشکر	۲۴۵۰۰	۱۲۰۳۰	۱۴/۶۶	۷/۳۶
خاک کشاورزی روستای کاغذی کاشان	۱۴۳۰۰	۷۲۲۰	۶/۸	۷/۲۲
خاک کشاورزی ابوزیدآباد کاشان	۱۳۸۵۰	۵۹۵۰	۶/۵	۷/۲
پساب کارخانه تولید آفت کش گیاه	۴۴۴	۲۲۲	۰/۰۱۴	۶/۹۱

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

جدایه	محل جداسازی	شکل میکروسکوپی	واکنش به رنگ آمیزی گرم	آزمون KOH ۳ درصد	آزمون کاتالاز	آزمون اکسیداز	محدوده تحمل نمک (درصد)	تعداد کلنی‌ها (CFU ^{۱۵} /ml)
CDB1	آب مزرعه نیشکر	میله‌ای	منفی	+	+	-	۱-۱۵	۱/۹×۱۰ ^۵
CDB2	آب مزرعه نیشکر	میله‌ای	منفی	+	-	+	۱-۱۵	۴×۱۰ ^۴
CDB3	آب مزرعه نیشکر	میله‌ای	منفی	+	+	+	۱-۱۵	۳/۲×۱۰ ^۴
CDB4	آب مزرعه نیشکر	میله‌ای	منفی	+	+	+	۱-۱۲/۵	۶/۳×۱۰ ^۵
CDB5	خاک کشاورزی ایوانکی	میله‌ای	منفی	+	+	+	۱-۲۰	۳/۸×۱۰ ^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	<i>Halomonas kenyensis</i> AIR-2 (T)	AY962237	۹۸/۱
	<i>Halomonas daqingensis</i> DQD2-30 (T)	EF121854	۹۷/۹
	<i>Halomonas desiderata</i> FB2 (T)	X92417	۹۷/۴

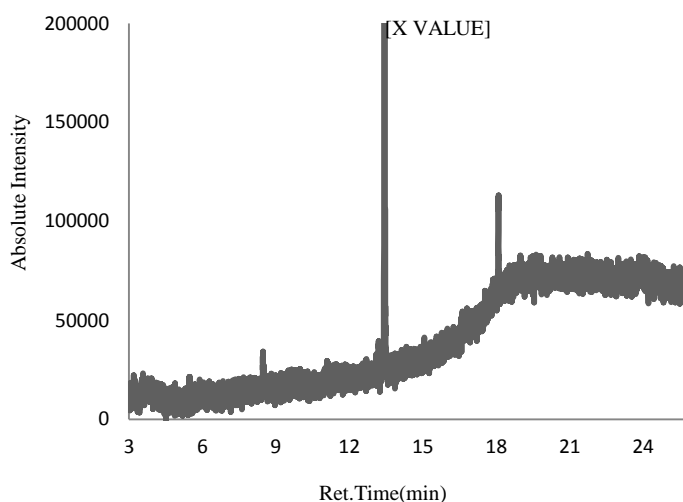


شکل ۱- درخت فیلوژنتیک سویه منتخب که با روش Neighbour-joining رسم و در آن، *Comamonas terrigena* (AF078772) به عنوان outgroup در نظر گرفته شده است. اعداد در بخش انشعاب، بوت استرپ از ۱۰۰۰ نمونه را نشان می دهند و مقادیر بوت استرپ کمتر از ۵۰ نشان داده نشده اند.

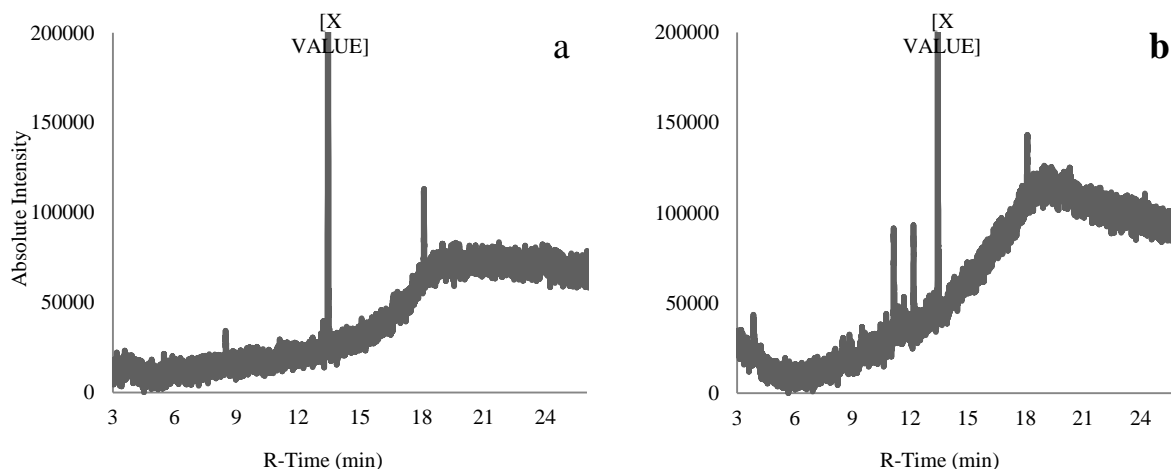
کروماتوگرام نمونه تلقیح شده با سویه CDB5 را نشان می دهند. نتیجه تحلیل درصد سطح زیر منحنی حاصل برای کلرپیریفوس در نمونه های تکنیکال، شاهد تلقیح شده و نمونه تلقیح شده با سویه CDB5 در جدول ۴ آورده شده است.

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 می کند. شکل ۲، کروماتوگرام نمونه تکنیکال، شکل ۳، a و b به ترتیب کروماتوگرام نمونه شاهد تلقیح نشده و



شکل ۲- کروماتوگرام GC-MS نمونه تکنیکال کلرپیریفوس



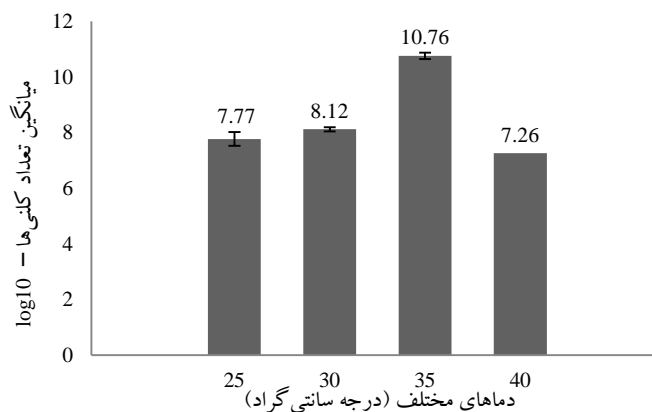
شکل ۳- a. کروماتوگرام GC-MS نمونه شاهد تلقیح نشده، b. کروماتوگرام GC-MS نمونه تلقیح شده با سویه CDB5 پس از ۱۰ روز گرماگذاری در دمای ۳۴ و حضور ۱۰۰ mg/l کلریپریفوس

جدول ۴- نتیجه تحلیل GC-MS نمونه تکنیکال، نمونه شاهد تلقیح نشده و نمونه تلقیح شده با سویه CDB5

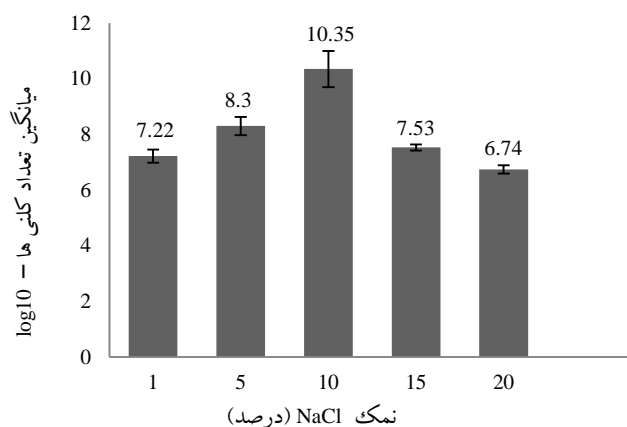
Area %	R-Time(min)	Sample	Name
۸۸/۹۷	۱۳/۴۶	تکنیکال	O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)- phosphorothioate (CP)
۸۶/۲۱	۱۳/۴۶	شاهد تلقیح نشده	
۶۰/۹۸	۱۳/۴۲	CDB5	

اسیدیته ۷ و غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر کلریپریفوس و در حضور آفت کش (تنها منبع کربن) بهترین رشد را دارد (شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷).

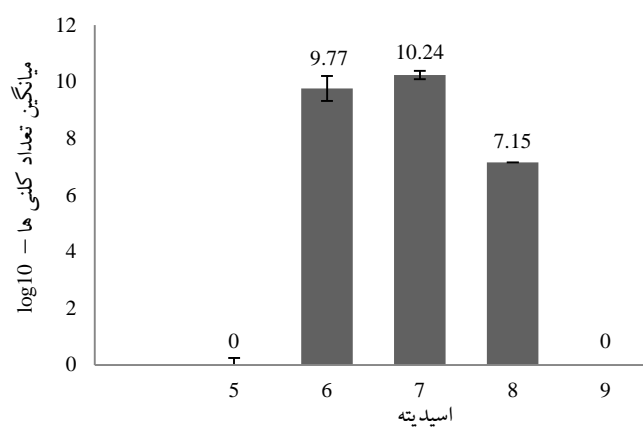
بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر رشد سویه منتخب در حضور آفت کش (تنها منبع کربن): بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر میزان رشد نشان داد که سویه منتخب در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، نمک ۱۰ درصد،



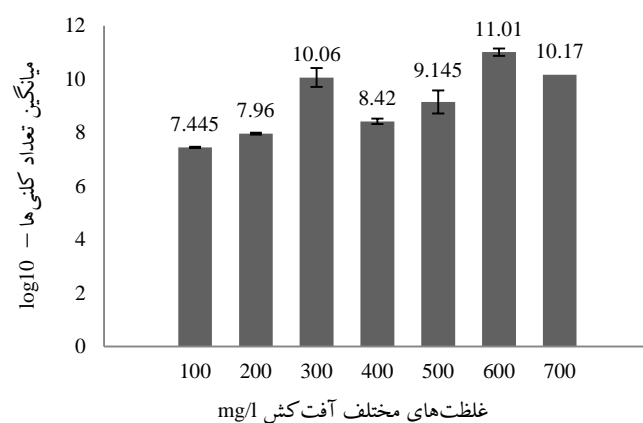
شکل ۴- بررسی اثر دما بر رشد سویه منتخب در حضور آفت کش کلریپریفوس (تنها منبع کربن)



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



شکل ۶- بررسی اثر میزان های مختلف اسیدیته بر رشد سویه منتخب در حضور آفت کش کلرپیریفوس (تنها منبع کربن)



شکل ۷- بررسی میزان رشد سویه منتخب در حضور غلظت های مختلف آفت کش کلرپیریفوس (تنها منبع کربن)

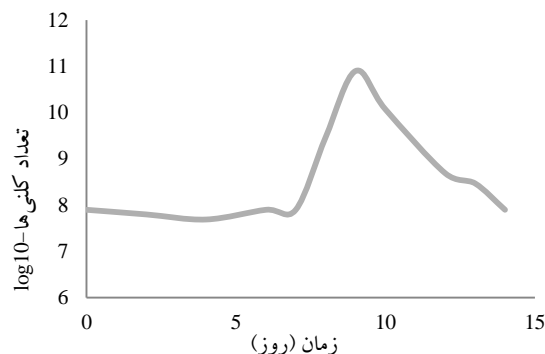
ریز موجودات نمک دوست و یا تحمل کننده نمک به علت ویژگی های فیزیولوژیک و تحمل بیشتر نسبت به فشارهای اسمزی زیاد، گزینه مناسبی برای پاکسازی خاک و یا آب های کشاورزی دارای شوری زیاد و املاح فراوان هستند. در سال های اخیر، توجه به موضوع تجزیه زیستی با نمک دوست ها در حال افزایش است و انواع مختلف تجزیه کننده های یوکاریوت و پروکاریوت نمک دوست و تحمل کننده نمک جداسازی و ویژگی های آنها بررسی شده است (۲۵-۲۸).

پژوهش های اندکی در زمینه پاکسازی آفت کش های ارگانوفسفاته توسط میکروارگانیسم های نمک دوست انجام شده است: دیفرانک^{۱۷} و چنگ^{۱۸}، سویه باکتریایی نمک دوست معتدل با عنوان JD6.5 را از دریاچه نمک گرانتسویل^{۱۹} 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 سایر گونه های این جنس را برای وجود آنزیم هیدرولیز کننده ارگانوفسفاته بررسی کردند و تشابه عملکرد آنزیمی را بین گونه های نزدیک نشان دادند (۲۹ و ۳۰).

هایس^{۲۰} و همکاران (۲۰۰۰)، متابولیسم ارگانوفسفونات^{۲۱}، کلاسی از ترکیبات ارگانوفسفاته را توسط سویه نمک دوست معتدل *Chromohalobacter marismortui* عضو خانواده *Halomonadaceae* نشان دادند (۳۱).

آنسسو^{۲۲} و همکاران (۲۰۰۷)، سویه باکتریایی نمک دوستی را از دریاچه نمک در رومانی جداسازی و رشد آن را در حضور آفت کش ارگانوفسفاته

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 آفت کش (تنها منبع کربن)

بحث و نتیجه گیری

آفت کش ها برای تولید در کشاورزی ضروری هستند. افزایش استفاده از آفت کش ها به میزان زیادی به تولید و کاهش خسارت ها در ذخیره سازی محصولات کمک می کند و باعث بهبود رفاه انسان ها می شود، هر چند استفاده از این مواد به ایجاد باقیمانده های نامطلوب به شکل ریز آلاینده ها^{۱۶} روی مواد غذایی، محیط زیست و بافت های زنده منجر می شود. این مواد از منطقه تیمار شده به مناطق دورتر در محیط حرکت می کنند و به موجودات غیرهدف می رسند (۲۳).

بیشترین آفت کش هایی که در سراسر دنیا استفاده می شوند، آفت کش های ارگانوفسفاته هستند. اگرچه این آفت کش ها نقش مهمی در محافظت از محصولات کشاورزی در برابر آفت ها و علف های هرز و نیز کنترل ناقلان بیماری ها دارند، عامل مشکل آلودگی جدی زیست محیطی هستند (۲۴).

باکتری های نمک دوست معتدل برای تجزیه ترکیبات سمی در غلظت های زیاد و متوسط نمک به کار می روند و استفاده دوباره از مواد باقیمانده صنعتی شور و محیط های شور آلوده را امکان پذیر می کنند، هر چند مطالعات اندکی در این زمینه انجام شده است (۳۵).

مطالعه های اندکی درباره توانایی اعضای جنس *Halomonas* و خانواده *Halomonadaceae* در پاکسازی زیستی آفت کش ها وجود دارند. در سال ۱۹۹۶ مالتسیوا^{۲۸} و همکاران، هالوموناس هایی با قابلیت استفاده از ترکیبات کلروآروماتیک به عنوان تنها منبع کربن و انرژی را جداسازی و تجزیه علف کش ۲ و ۴-دی کلروفنو کسسی استیک اسید (2,4-D) را به طور جزئی مطالعه کردند (۳۶).

همچنین کلینستور^{۲۹} و همکاران (۲۰۰۱)، استفاده از سویه قلیادوست و نمک دوست معتدل *Halomonas* sp. strain EF43 را برای بیان مسیر تجزیه ای 2,4-D با استفاده از پلاسمید pJP4 گزارش کردند (۳۷).

آفت کش بررسی شده در پژوهش حاضر از گروه ترکیبات ارگانوفسفاته است و بررسی مطالعه ها درباره تجزیه زیستی ترکیبات ارگانوفسفاته توسط خانواده *Halomonadaceae* نشان داد، تنها مطالعه هایس و همکاران که پیش تر به آن اشاره شد (۳۱)، متابولیسم ارگانوفسفونات را بررسی کرده است. درباره تجزیه زیستی ترکیبات ارگانوفسفاته توسط جنس *Halomonas* و تجزیه زیستی آفت کش کلرپیریفوس توسط نمک دوست ها گزارشی یافت نشده است.

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

دیکلرئوس^{۳۳} (DDVP) بررسی کردند. آنها نشان دادند که این سویه با مکانیسم استفاده از «اسمولایت آلی^{۲۴}»، آفت کش را به درون سیتوپلاسم سلول جذب می کند و باعث حذف آن در محیط نمکی می شود (۳۲).

پراوین^{۲۵} و همکاران (۲۰۱۲)، تجزیه آفت کش اندوسولفان از گروه ارگانوکلرین ها و متیل پاراتیون از گروه ارگانوفسفاته ها را توسط سویه باکتریایی از شاخه اکتینومیست ها و جداساده از دریا به نام *Nocardopsis* sp. نشان دادند (۳۳).

در سال ۲۰۱۳، ناوینا^{۲۶} و همکاران سویه ACT 1 *Streptomyces venezuelae* تحمل کننده نمک جدا شده از آب دریا را برای تجزیه آفت کش ارگانوفسفاته پاراتیون انتخاب و فعالیت ارگانوفسفروس هیدرولازی آن را بررسی کردند (۳۴).

نتایج نشان دادند که سویه نمک دوست 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 نمک دوست معتدل است که از لحاظ فنوتیپی بسیار گسترده هستند. جنس های *Halomonas* و *Chromohalobacter* به عنوان الگوهای نمک دوست مطالعه شده اند. گونه های خانواده *Halomonadaceae* برای بسیاری از اهداف زیست فناوری استفاده می شوند. تاکنون کاربردهای بسیار متفاوتی پیشنهاد شده اند و برخی کاربردهای اعضای این خانواده عبارتند از: تولید محلول های سازگاری^{۲۷}، ترکیبات خارج سلولی از جمله آگروپلی ساکاریدها و آنزیم ها و استفاده از آنها در فرایندهای پاکسازی زیستی. این باکتری ها و سایر

میزان برای رشد و تجزیه آفت کش توسط سویه در نظر گرفته 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، کلریپریفوس را تجزیه می‌کنند (۱۱). بررسی رشد سویه در اسیدیته‌های مختلف نشان داد که سویه منتخب در اسیدیته ۷ بهترین رشد را در حضور آفت کش دارد. این اسیدیته مشابه شرایط جداسازی سویه و مشابه اسیدیته محل جداسازی نمونه است.

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

منابع نشان می‌دهند هرچه غلظت آفت کش در محیط افزایش یابد، میزان سمیت و پایداری آن بیشتر می‌شود (۱۲). مطالعه‌های پیشین در زمینه تجزیه آفت کش کلریپریفوس نشان می‌دهند که سویه‌های باکتریایی قادر به تجزیه کلریپریفوس 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 کلریپریفوس کاهش می‌یابد (۱۱).

در پژوهش حاضر مشخص شد سویه منتخب در غلظت زیاد کلریپریفوس و نبود منبع کربنی بجز آفت کش، 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 کلریپریفوس،

میلی‌گرم در لیتر کلریپریفوس (تنها منبع کربن) است. با توجه به اینکه شرایط رشدی برای سویه، شرایط تنشی بدون هرگونه منبع کربن بجز آفت کش 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 بهتر کردن شرایط رشد، شرایط تجزیه‌ای نیز بهتر می‌شود. مقایسه کروماتوگرام نمونه تکنیکال با نمونه شاهد تلقیح‌نشده نیز حاکی از آن است که طی گرماگذاری، غلظت آفت کش به میزان زیادی پایدار است.

بررسی فاکتور دما نشان داد که سویه منتخب در حضور آفت کش و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، بهترین رشد را دارد. بررسی مطالعه‌های پیشین نشان می‌دهد که بیشتر سویه‌های باکتریایی جداسازده 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 کلریپریفوس انجام نشده است (۱۱).

بررسی مطالعه‌های موجود درباره تجزیه زیستی آفت کش‌ها توسط نمک‌دوست‌ها نشان می‌دهد که سویه‌های معرفی شده 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 آفت کش و ۱۰ درصد نمک داشت و در نتیجه این درصد نمک، بهترین

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 *Acremonium* sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil. *Biology and fertility of soils* 2011; 47: 219-225.

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

بررسی رشد سویه منتخب با رسم منحنی رشد نشان می دهد 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 متابولیت ها هنگام شکستن آفت کش از جمله متابولیت TCP است که مهم ترین و اصلی ترین متابولیت حاصل از شکست کلرپیریفوس و ماده ای سخت و مقاوم در برابر تجزیه زیستی و غیرزیستی است (۱۵). افزایش رشد بعدی به علت سازگاری به حضور متابولیت ها و شکستن آنهاست.

در مجموع، با توجه به مشکلات یادشده درباره استفاده مکرر و فراوان آفت کش های ارگانوفسفاته و خطرهای زیست محیطی ناشی از آنها، وجود مشکل شوری در بخش کشاورزی به ویژه زه آب ها، وجود مشکل کم آبی و در نتیجه استفاده مکرر از زه آب ها برای تکمیل منابع آب، استفاده از روشی سازگار با محیط زیست برای پاکسازی آلاینده ها اهمیت ویژه ای دارد. در پژوهش حاضر مشخص شد که باکتری های نمک دوست به علت سازگاری با محیط های شور راهکاری برای تجزیه زیستی آفت کش های ارگانوفسفاته هستند.

تشکر و قدردانی

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

- (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., Shaik 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) Karpouzias 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., Hasheminejad 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.

- (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 nocardiosis 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) Arahall 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., Oriol 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- fenig 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- $\mu\text{S}/\text{cm}$
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