Journal of Research in Environmental Health

Volume 9, Issue 1, Spring 2023

Biodegradability of Diazinon Poison in Grand Soils by Bacterias Isolated from them

Mona Mansouri
PhD student of Environmental Pollution, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
Aptin Rahnavard
* Assistant Professor, Department of Environmental, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
rahnavard_aptin@yahoo.com
Masood Ghane
Associate Professor, Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Received: 2022/11/01
Accepted: 2023/02/20

Document Type: Research article

Doi:10.22038/jreh.2023.68018.1552

ABSTRACT

Background and purpose: Diazinon is an organophosphorus insecticide that is widely used in paddy fields and gardens. The entry of resistant pollutants into drinking water sources, soil, and agricultural products can be harmful to human health and the environment. This study aimed to identify and isolate diazinon-degrading bacteria and measure the amount of poison decomposed by superior bacteria in liquid and soil environments.

Materials and Methods: Sampling was conducted from Tonekabon gardens. The strains were identified and sequenced using polymerase chain reaction based on 16S rRNA. The rate of diazinon degradation by the isolated bacteria was measured by gas chromatography.

Results: Two strains of diazinon-degrading bacteria, Serratia and Enterobacter cloacae, were identified. Bacteria with diazinon concentrations of 10 and 20 ppm were cultured in broth and soil for 10 days, and the amount of poison decomposition was measured. The results indicated that Serratia bacteria in the broth medium, with initial concentrations of 10 and 20 ppm, consumed 64.3% and 78.4% of diazinon, respectively, while in the soil with the same concentration, it decomposed 90.2% and 98.25% of diazinon. Enterobacter cloacae bacteria consumed and decomposed diazinon in the broth and soil environments, with percentages of 23.1, 17.95, 31.19, and 88.05%, respectively. According to the results, Serratia has a higher decomposition ability compared to Enterobacter.

Conclusion: The results of this research showed that some microorganisms in the soil have the ability to decompose diazinon. Utilizing these microorganisms and other biological methods to clean contaminated soils can be a suitable approach.

Keywords: Bacteria, Soil, Diazinon, Biodegradability, Serratia

Citation: Mansouri M, Rahnavard A, Ghane M. Biodegradability of Diazinon Poison in Grand Soils by Bacterias Isolated from them. *Journal of Research in Environmental Health*. 2023; 9(1):66-76.

زیست تخریب‌پذیری سم دیازینون موجود در خاک‌های باغی توسط باکتری‌های جدا شده از آن‌ها

منا منصوری
دانشجوی دکتری آلودگی محیط‌زیست، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.
آپتین راه‌نورد
✱ استادیار، گروه محیط زیست، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران. (نویسنده مسئول):
rahnavard_aptin@yahoo.com
مسعود قانع
دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱

نوع مقاله: پژوهشی

چکیده

زمینه و هدف: دیازینون، یک حشره‌کش ارگانوفسفره است که به‌طور گسترده در شالیزارها و باغات استفاده می‌شود. ورود آلاینده مقاوم به منابع تأمین آب شرب، خاک و محصولات کشاورزی، می‌تواند اثرات مخربی بر سلامت انسان و محیط زیست داشته باشد. مطالعه حاضر با هدف شناسایی و جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سم دیازینون و سنجش مقدار سمی که باکتری‌های برتر در محیط مایع و خاک تجزیه می‌کنند، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش نمونه‌برداری از باغات تنکابن انجام شد. شناسایی و تعیین توالی سویه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز بر اساس ۱۶S rRNA صورت گرفت. میزان تجزیه دیازینون توسط باکتری‌های جدا شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی سنجش شد.

یافته‌ها: دو سویه باکتری تجزیه کننده دیازینون از جنس سراشیا و انتروباکترکلوآکا شناسایی شدند. باکتری‌ها با غلظت ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام دیازینون در محیط براث و خاک به‌مدت ۱۰ روز کشت داده شدند و مقدار تجزیه سم مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بر اساس نتایج، باکتری سراشیا در محیط براث با غلظت اولیه ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام، ۶۴/۳٪ و ۷۸/۴٪ مصرف دیازینون داشت و در محیط خاک با همین غلظت ۹۰/۲٪ و ۹۸/۲۵٪ سم دیازینون را تجزیه کرد. باکتری انتروباکترکلوآکا در محیط براث و خاک به‌ترتیب ۲۳/۱٪، ۱۷/۹۵٪ و ۳۱/۱۹٪، ۸۸/۰۵٪ دیازینون را مصرف و تجزیه کرد. با توجه به نتایج حاصل، باکتری سراشیا بیشترین قابلیت تجزیه را نسبت به انتروباکتر دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد برخی میکروارگانیسم‌های موجود در خاک، توانایی تجزیه دیازینون را دارند. استفاده از این میکروارگانیسم‌ها و دیگر روش‌های زیستی جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده می‌تواند روش مناسبی باشد.

کلیدواژه‌ها: باکتری، خاک، دیازینون، زیست تخریب‌پذیری، سراشیا

◀ **استناد:** منصوری م، راه‌نورد الف، قانع م. زیست تخریب‌پذیری سم دیازینون موجود در خاک‌های باغی توسط باکتری‌های جدا شده از آن‌ها. *فصلنامه پژوهش در بهداشت محیط*. بهار ۱۴۰۲؛ ۹ (۱): ۷۶-۶۶.

مقدمه

آفت‌کش‌ها یکی از آلاینده‌هایی هستند که به‌علت رشد روزافزون جمعیت و افزایش نیاز به تولیدات کشاورزی و مواد غذایی، استفاده از آن‌ها در بخش کشاورزی در حال افزایش است و در طی دهه‌های گذشته، جزء ضروری دنیای کشاورزی بوده‌اند (۱). سموم مورد استفاده در کشاورزی می‌توانند از طریق آبیاری، بارندگی و انتقال از طریق نهرهای انحرافی، وارد منابع آب سطحی شده و سبب آلودگی این آب‌ها شوند که این مسئله می‌تواند اثرات ناخوشایندی را هم به‌طور غیرمستقیم از طریق اثر بر روی محصولات کشاورزی و ورود به زنجیره غذایی و هم به‌طور مستقیم از طریق اثر بر سلامتی افرادی که در نزدیکی این منابع زندگی و از این منابع استفاده می‌کنند، ایجاد کند (۲). آفت-کش‌های ارگانوفسفره (OPs)[1] در اواسط سال ۱۹۶۰ برای جایگزینی ارگانو کلره و کنترل آفات با این فرض که سمّیت بالا و ماندگاری کمتری دارند، معرفی شدند (۳، ۴). استفاده بیش از حد از آفت‌کش‌ها منجر به ماندگاری بقایای آن‌ها در محیط برای یک دوره نامشخص می‌شود که می‌تواند تهدیدهای مهمی برای اکوسیستم آبی و خشکی ایجاد کند (۵). دیازینون، یک حشره-کش ارگانوفسفره است که به‌طور گسترده در شالیزارها و باغات ایران استفاده می‌شود. به‌دلیل حلّالیت کم در آب، نفوذ دیازینون به آب‌های زیرزمینی بسیار کم است، اما به‌طور نسبی پتانسیل اتصال بالایی به خاک دارد. علاوه بر این، بسته به هوادهی در خاک، هفته‌ها تا ماه‌ها حتی در آب باقی می‌ماند (۶). این سم با توجه به pH، دما، نور خورشید و میکروارگانیسم‌ها،نیمه‌عمر ۷ ساعت تا ۱۲ هفته‌ای در آب دارد (۷) و همچنین ۲۱-۱۰۳ روز در خاک باقی می‌ماند (۸). از متداول‌ترین روش‌های استفاده شده برای حذف آن جذب حرارتی، شستشوی خاک‌های آلوده، حذف زیستی، تصفیه در زمین، فرآیندهای شیمیایی و فرآیندهای اکسیداسیون مستقیم است (۹). در این راستا یکی از روش‌های درمانی امیدوار کننده برای از بین بردن آلاینده‌ها از مکان‌های آلوده، بهره برداری از توانایی میکروارگانیسم‌ها است. در این فرآیند، میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یک استراتژی درمانی جایگزین به‌دلیل اثربخشی، خطر کم، ارزش اقتصادی و ایمنی محیط‌زیست به‌عنوان پالایش زیستی شناخته می‌شود. زیست‌پالایی از میکروارگانیسم‌های خاصی برای تجزیه مواد شیمیایی مصنوعی خطرناک در محیط استفاده می‌کند (۱۰). در کشور ما با توجه به وسعت استفاده از سموم ارگانوفسفره در سالیان دراز، نیاز به روش‌های پاک‌سازی کارآمد، اقتصادی و سازگار با محیطزیست برای رفع آلودگی خاک‌های آغشته به این ترکیب‌ها احساس می‌شود. پروژه‌های میدانی پاک‌سازی زیستی خاک در کشور ما خیلی کم به اجرا درآمده است. از مهم‌ترین عوامل، ناشناخته بودن میکروارگانیسم‌های بومی در تجزیه ترکیب‌های ارگانوفسفره می‌باشد. تحقیقاتی در جهان برای حذف بیولوژیکی آفت‌کش‌ها انجام شده است (۱۱). فتحی و همکاران در مطالعه‌ای باکتری هایی از خانواده باسیلوس در خاک مزارع آلوده به سم جداسازی کردند که قادر به تجزیه سم آلی کلروپیریفوس بودند (۱۲). نتایج مطالعه نصرالهی و همکاران که در مورد تأثیر باکتری‌های اندوفیت برنج بر تخریب دیازینون انجام شد، نشان داد اندوفیت های جدا شده، توانایی تجزیه دیازینون را داشته و از آن به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. در تعیین توالی مشخص شد جدایه‌ها مربوط به جنس باسیلوس است (۱۳). بریسنو و همکاران توانایی تجزیه زیستی سویه‌های استرپتومایسس را برای حذف چهار نوع آفت‌کش ارگانوفسفره به‌طور همزمان بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند سویه مورد این قابلیت را دارد (۱۴). عبادی و همکاران نشان سویه مخمری کاندیداسودولامبیکا را از خاک کشاورزی آلوده به آفت‌کش جدا کردند که قادر به تجزیه زیستی دیازینون بود (۱۵). در مطالعه یاسین و همکاران که با هدف جداسازی قارچ‌های تجزیه کننده دیازینون انجام شد، در مجموع ۱۳ سویه قارچ را از خاک آلوده جدا کردند، اما بیشترین مقدار تجزیه دیازینون توسط ۶ سویه A.niger، B.antennata، F.graminearum، P.digitatum، R.stolonifer وT.viride انجام گرفت. از بین این سویه‌ها، مؤثرترین سویه B.antennata بود که بیشترین مقدار تجزیه طی ۱۰ روز را انجام داد (۱۶). حمد توانایی،مطالعه ای در زمینه نقش قارچ آسپرژیلوس نایجر برای حذف دیازینون در محیط آبی انجام داد. و به این نتیجه رسید آسپرژیلوس با کمترین هزینه و کارایی بالا، قادر به حذف دیازینون است (۸). وانگ و لیو سویه DI-۳

[1]Organophosphorus pesticide

از خانواده Ralstonia را از خاک کشاورزی جدا کردند که سویه ذکر شده، قابلیت تجزیه دیازینون را داشت (۱۷). پاندا و همکار تحقیقی در زمینه بررسی تجزیه زیستی یک قارچ‌کش سرطانزا (کاربندازیم) توسط سویه باکتری جدید Baciluslicheniformis JTC-۳ جدا شده از پساب کشاورزی انجام دادند. نتایج تحقیق نشان داد این سویه قابلیت تجزیه سم را دارد (۱۸). وانگ و همکاران مطالعه‌ای با هدف تجزیه زیستی دیازینون انجام دادند، در این پژوهش یک باکتری تجزیه کننده دیازینون (DI-۶) که قبلاً از خاک آلوده به دیازینون در چین جدا شده بود، بر اساس ویژگی‌های فیزیولوژی و بیوشیمیایی آن و همچنین با روش تجزیه و تحلیل و توالی ۱۶S rRNA به‌عنوان Sphingobiumشناسایی شد. این سویه قادر به استفاده از دیازینون به‌عنوان تنها منبع کربن برای رشد توانست ۹۱/۸٪ از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر دیازینون را در یک بازه زمانی ۶۰ ساعته تجزیه کند. در مطالعه آنها تجزیه سم با دستگاه کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) سنجیده شد (۱۹). مطالعه حاضر با هدف شناسایی و جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سم دیازینون از خاک آلوده و سنجش قابلیت تجزیه زیستی آن‌ها انجام شد.

روش‌کار

نمونه‌برداری

نمونه‌ای از خاک یک باغ مرکبات آلوده به دیازینون واقع در استان مازندران، شهرستان تنکابن با مختصات طول جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۵ دقیقه و عرض جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۲ دقیقه گرفته شد. نمونه در فصل بهار و شرایط کاملاً استریل و با استفاده از دستکش جمع‌آوری گردید؛ بدین‌صورت که لایه رویی خاک کنار زده و از عمق ۱۰-۰ سانتی‌متری برداشت و داخل کیسه پلاستیکی غیرقابل نفوذ ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به آزمایشگاه انتقال یافت (۲۰).

غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده دیازینون

سم دیازینون مورد استفاده با خلوص ۹۹٪ از شرکت سیگما آلدریچ آلمان خریداری شد. به‌منظور جداسازی جمعیت‌های باکتریایی با قابلیت تجزیه دیازینون، از روش غنی‌سازی در محیط کشت تریپتیک سوی براث استفاده شد. ۳۰ گرم از محیط در هر۱ لیتر آب تهیه گردید. پس از اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه و خنک کردن، سم دیازینون در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان منبع اصلی کربن به ۳ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه و ۱ گرم خاک به هر یک از ارلن‌ها افزوده شد. اطراف ارلن‌ها برای جلوگیری از تجزیه نوری سم با ورق آلومینیومی پوشانده و ارلن-های حاوی محیط کشت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به‌مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سپس در شرایط استریل ۱ میلی‌لیتر (رقت 10^{-4})، ۰/۱ میلی‌لیتر (رقت 10^{-5}) از ارلن شماره ۲ و ۱ میلی‌لیتر (رقت 10^{-6})، ۰/۱ میلی‌لیتر (رقت 10^{-7}) از ارلن شماره ۳ بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار ریخته و کشت داده شد، سپس به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا مقدار رشد باکتری‌ها مشخص شود. جهت خالص‌سازی باکتری‌ها، نمونه‌های برداشت شده از پلیت‌ها با روش سفره‌ای و خطی کشت داده شدند. کلنی‌های مختلفی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار تشکیل گردید که پس از چند بار کشت، سرانجام کلنی‌های تک به‌دست آمد. سپس هر کلنی در محیط کشت جدید خالص‌سازی شد.

رشد سویه‌ها در غلظت‌های مختلف سم

در این مطالعه ۱۰ لوله آزمایش محیط کشت تریپتیک سوی براث آماده و درون هر لوله ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث و غلظت‌های مختلف (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر) سم با سمپلر اضافه شد. هر یک از باکتری‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حل و میزان کدورت آن‌ها با لوله ۰/۵ مک فارلند کنترل گردید. ۱ میلی‌لیتر از هر لوله حاوی باکتری به محیط کشت اضافه و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت کشت سفره‌ای انجام شد.

خصوصیات بیوشیمیایی و ژنوتیپی

جهت شناسایی اولیه باکتری‌ها از روش بیوشیمیایی (رنگ‌آمیزی گرم و تست هیدروکسیدپتاسیم[1]) برای شناسایی نهایی باکتری ها از روش مولکولی استفاده گردید. استخراج DNA با استفاده از

[1]Potassium Hydroxide

کلونی‌های تک و خالص و توسط کیت شرکت کیاژن طبق دستورالعمل کیت صورت پذیرفت. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن (اسیدریبونوکلئیک ریبوزومی) ۱۶S rRNA انجام گردید. توالی این پرایمرها عبارتند از:

پرایمر برگشتی:
{۱۴۹۲Revers:۵'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-۳'}
پرایمر رفت:
{۲۷ Forward:۵'-AGAGTTTGAACMTGGCTCAG-۳'}

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. مواد مصرفی برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل: مستر میکس ۲x (Master mix 2x) ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمر F ۲۷ و R ۱۴۹۲ از هر کدام ۱ میکرولیتر، آب دیونیزه ۵/۵ میکرولیتر و نمونه ۵ میکرولیتر بود. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بدین‌صورت بود که دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۸/۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه صورت گرفت. چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۲ میکرولیتر محلول رنگ مخلوط و درون چاهک ژل آگارز ۱٪ ریخته شد. ژل در دستگاه UVidoc قرار داده شد و موقعیت باندها توسط دستگاه UV ترنس لومیناتور زیر اشعه بررسی گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تعیین توالی به کره جنوبی فرستاده شد. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار Blast در بانک ژن سایت ncbi با دیگر توالی‌های موجود در این پایگاه اطلاعاتی مورد مقایسه قرار گرفت (۲۱). یک درخت فیلوژنتیک برای روابط تکاملی بین سویه‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل ژنتیک تکاملی مولکولی، نرم‌افزار مگا (MEGA X) ساخته شد (۲۱).

اندازه‌گیری باقی‌مانده دیازینون

کشت باکتری در خاک

در این پژوهش ۲۰ گرم نمونه خاک به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. سپس درون هر پلیت ۱۰ گرم خاک ریخته و از هر باکتری موردنظر کشت داده شده در محیط تریپتیک سوی آگار، سوسپانسیونی در محیط تریپتیک سوی براث تهیه و به خاک اضافه گردید. به هر یک از پلیت‌ها به‌ترتیب ۱۰ و ۲۰ پی پی ام سم دیازینون اضافه و به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. این کشت برای چند باکتری مدنظر جداگانه انجام پذیرفت.

کشت باکتری در محیط براث (مایع)

محیط کشت تریپتیک سوی براث به مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر تهیه و درون ۲ ارلن به مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته شد. به هر یک از ارلن‌ها به‌ترتیب ۱۰ و ۲۰ پی پی ام سم دیازینون اضافه گردید. سوسپانسیونی از باکتری مدنظر با غلظت ۰/۵ مک فالند تهیه و به هر یک از ارلن‌ها افزوده گردید. ارلن‌ها به‌مدت ۱۰ روز در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. با توجه به تعداد باکتری‌ها، برای تمام باکتری این کشت انجام شد.

استخراج باقی‌مانده دیازینون

برای استخراج آفت‌کش از محیط براث، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط ارلن برداشت و با آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و سپس دو باربه مدت نیم ساعت با ۲۰ میلی‌لیتر، n- هگزان بر روی شیکر قرار داده شد.پس از آن، با استفاده از قیف جدا کننده، فاز آلی از فاز آبی جدا شده و ماده استخراج شده با استفاده از سولفات سدیم بدون آب تیمار شدند تا آب باقی‌مانده حذف شود. با استفاده از اواپوراتوردوار، تحت جریان N_2 در دما ۴۵ درجه سانتی‌گراد آن را خشک کرده و با استون در حجم ۱۰ میلی‌لیتر رقیق شد (۲۳). برای استخراج دیازینون در نمونه‌های خاک، ابتدا به ۵ گرم خاک، ۳ میلی‌لیتر آب افزوده (۱ دقیقه ورتکس)، سپس ۷ میلی‌لیتر حلال استونیتریل (۱ دقیقه ورتکس ۴ گرم منیزیم سولفات بدون آب و ۱ گرم سدیم کلرید (مدت ۱ دقیقه ورتکس) و در انتها سانتریفیوژ (۱ دقیقه، ۶۰۰۰ دور در دقیقه) انجام شد. به‌منظور حذف ناخالصی‌های احتمالی، خالص‌سازی با روش استخراج فاز جامد پخش شونده (dSPE)[1] انجام شد.

[1]Dispersive solid phase extraction

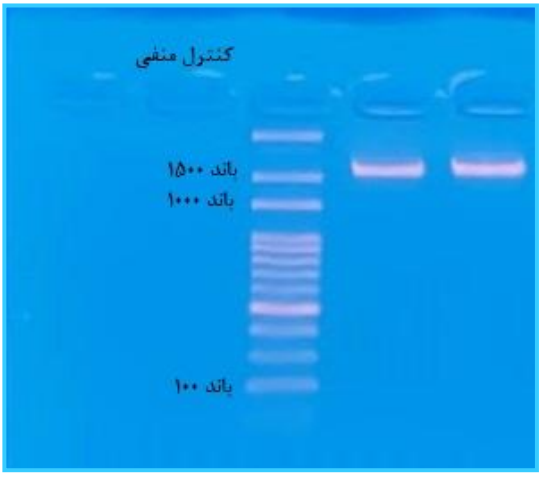
بدین‌منظور، ۱ میلی‌لیتر از رونشین حاصل از سانتریفیوژ به لوله‌های فالکن ۱۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم منیزیم سولفات بدون آب، ۲۵ میلی‌گرم آمین اولیه و ثانویه و ۲/۵ میلی‌گرم کرن سیاه گرافیتی منتقل و بعد از تکان دادن به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. رونشست حاصل از سانتریفیوژ در دمای اتاق با دمیدن گاز نیتروژن تبخیر گردید (۱).

سپس نمونه‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC)[1] با دکتور آشکارساز یونش شعله‌ای (FID)، ستون مویینه مجهز به HP-۵، گاز حامل هیدروژن و نیتروژن، دمای اولیه ستون ۶۰ درجه سانتی‌گراد، دمای نهایی ستون ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد، دمای تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و دمای دکتور ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد مورد سنجش قرار گرفتند (۲۲، ۲۳).

یافته‌ها

جداسازی و شناسایی سویه تجزیه کننده

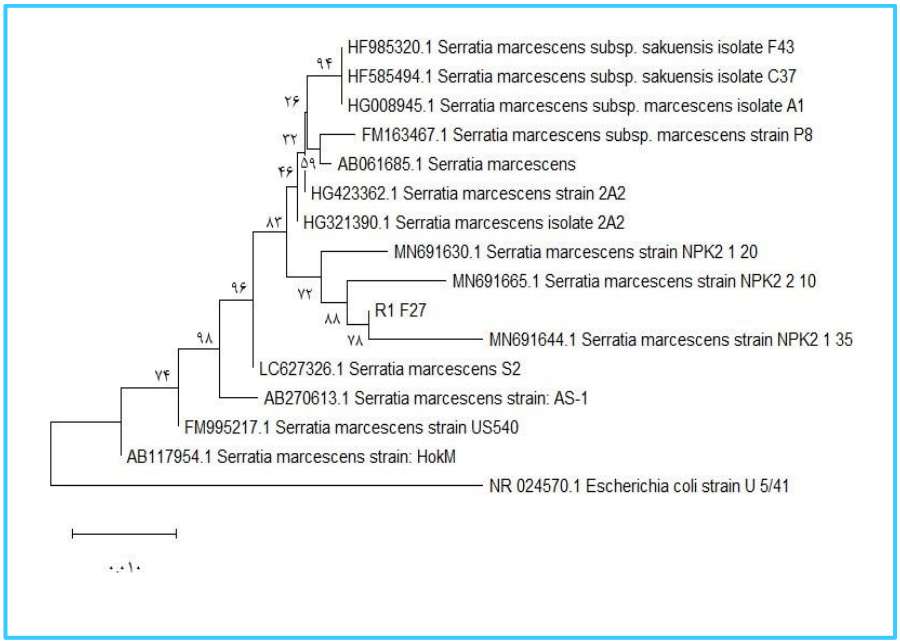
در کشت اولیه و غنی‌سازی، دو سویه باکتری R و S بیشترین رشد را در غلظت‌های مختلف سم داشتند. نتایج آزمایش بیوشیمیایی، سویه‌ها را از نوع گرم منفی شناسایی کرد. دیازینون در غلظت‌های مختلف کشت داده شد که در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام رشد خوبی داشت، ولی در غلظت ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام رشد کمتری از خود نشان داد. شناسایی مولکولی باکتری‌ها با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی ۱۶ S rRNA انجام و محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بارگذاری شده در ژل بر باند ۱۵۰۰ قرار گرفت. شکل ۱ نحوه قرارگیری نمونه‌ها در باند موردنظر را نشان می‌دهد. آنالیزهای فیلوژنتیک مولکولی نشان داد سویه R مربوط به جنس سراشیا[2] و سویه S متعلق به جنس انتروباکترکلوآکا[3] است. سراشیا شباهت ۹۸ درصدی به سراشیا مارسسنس[4] و انتروباکتر شباهت ۹۰ درصدی به انتروباکتر کوبی Enterobacter kobei داشت. در شکل ۲ و ۳ درخت فیلوژنی (تاریخچه تکاملی) با روش نزدیکی، همسایگی[5] برای سویه‌ها رسم شد. درخت فیلوژنی با طول شاخه ۰/۴ نشان داده شده است. درصد تشابه هرگونه به گونه مورد نظر در تست بوت استرپ جمع شده و در کنار شاخه‌ها قرار دارد.



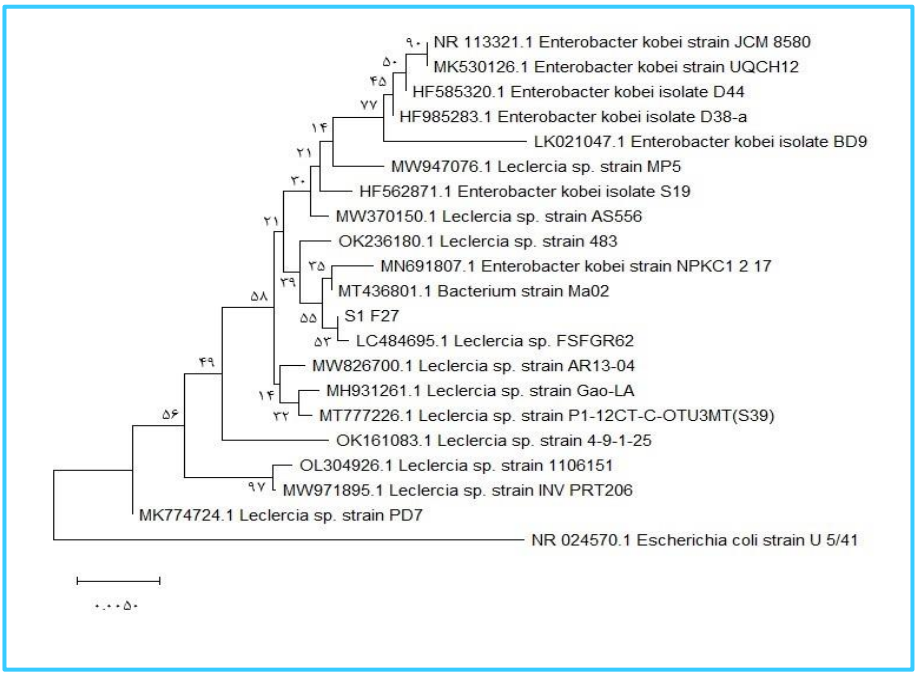
شکل ۱. باندهای مربوط به سویه‌های جدا شده (قطعه وباند ۱۵۰۰)

[1]Gas Chromatography

[2]Serratia sp
[3]Enterobacter cloacasp
[4]Serrasia marcescens
[5]Neighbor-joining



شکل ۲. درخت فیلوژنی برای سویه سراشیا



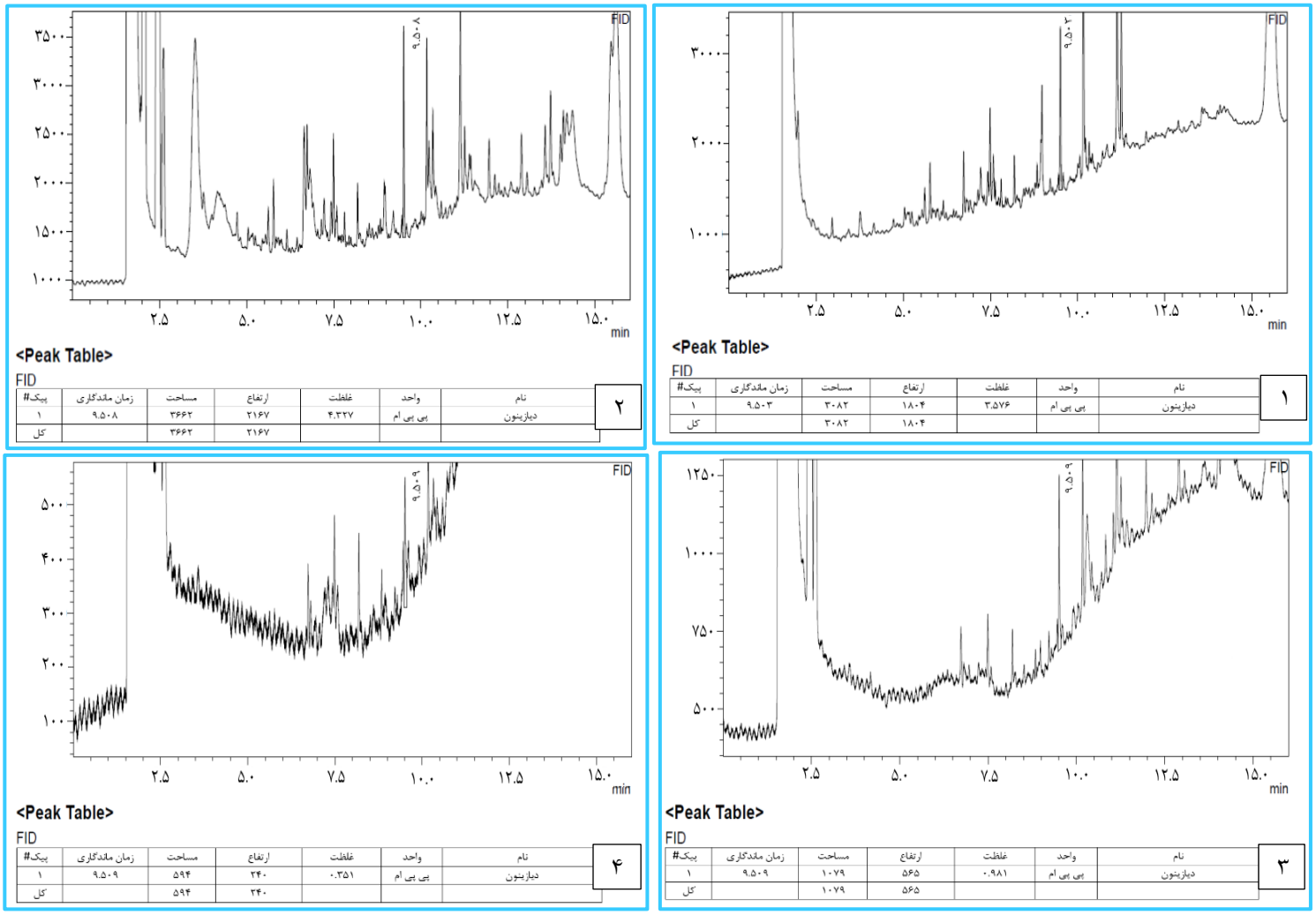
شکل ۳. درخت فیلوژنی برای سویه انتروباکتر کلوآکا

تجزیه دیازینون توسط سویه سراشیا و انتروباکترکلوآکا در کشت مایع و خاک

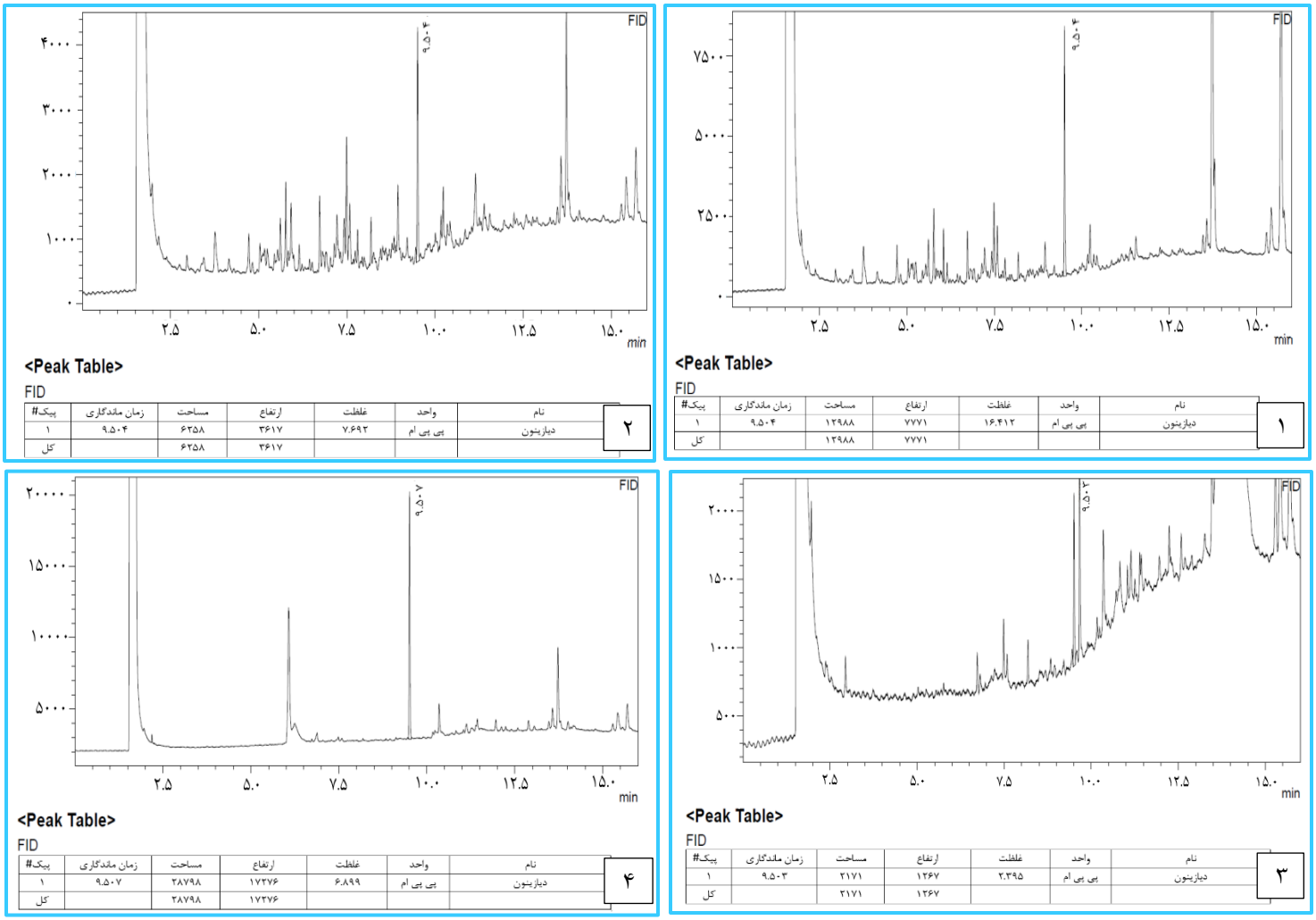
نمونه‌ها بعد از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شدند تا مقدار تجزیه هر یک از باکتری‌ها اندازه‌گیری شود. نمودار ۱، باقی‌مانده سم در کشت مایع و جامد باکتری سراشیا و نمودار ۲، باقی‌مانده دیازینون حاصل از عملکرد انتروباکتر کلوآکا را نشان می‌دهد. در جدول ۱، نتایج کروماتوگرافی به‌صورت عدد ارائه شده است.

جدول ۱. نتایج تجزیه و مقدار باقی‌مانده دیازینون

باکتری	واحد	مقدار دیازینون در براث	باقی‌مانده دیازینون	مقدار دیازینون در خاک	باقی‌مانده دیازینون
سراشیا	پی‌پی‌ام	۱۰	۳/۵۷	۱۰	۰/۹۸
	پی‌پی‌ام	۲۰	۴/۳۲	۲۰	۰/۳۵
انتروباکترکلوآکا	پی‌پی‌ام	۱۰	۷/۶۹	۱۰	۶/۸۹
	پی‌پی‌ام	۲۰	۱۶/۴۱	۲۰	۲/۳۹



نمودار ۱. تجزیه دیازینون توسط باکتری Serratiasp در محیط براث و خاک با غلظت ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام



نمودار ۲. تجزیه دیازینون توسط باکتری آنتروباکترکلوآکا در محیط براث و خاک با غلظت ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام

بحث

کروماتوگرام مربوط به تزریق، استاندارد آفت‌کش دیازینون به دستگاه GC و زمان بازداری این آفت‌کش را نشان می‌دهد. در این تحقیق زمان بازداری برای تمام غلظت‌ها ۹/۵ دقیقه بود و نمونه‌ها ۱۰ روز در محیط کشت نگهداری شدند. کروماتوگرام های مربوط به سراشیا نشان داد مقدار مصرف سم و تجزیه آن در غلظت کروماتوگرام ۱ و ۱۰ پی‌پی‌ام و کروماتوگرام ۲ و ۲۰ پی‌پی‌ام محیط براث توسط باکتری سراشیا به‌ترتیب ۶۴/۳٪ و ۷۸٪/۳ و در کروماتوگرام ۳ و کروماتوگرام ۴ محیط خاک در همین غلظت ۹۰/۲٪ و ۹۸/۲۵٪ به‌دست آمد. همین مقدار دوز مصرفی برای باکتری انتروکلوآکا تزریق شد و کروماتوگرام ۱ و ۲ در غلظت ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام در محیط براث ۲۳/۱٪ و ۱۷/۹۵ ٪ و در کروماتوگرام ۳ و ۴ محیط خاک به‌ترتیب ۳۱/۱۹٪ و ۸۸٪/۰۵ تجزیه انجام گرفت. هر دو باکتری توانایی و قابلیت تجزیه دیازینون را دارا بودند، اما در محیط خاکی این قابلیت بیشتر بود. این موضوع نشان می‌دهد در نمونه‌ها کاهش غلظت آفت‌کش در اثر فعالیت باکتری و استفاده آفت‌کش موجود در محیط به‌عنوان منبع کربن و فسفر توسط جدایه‌ها است. تاکنون مطالعات زیادی در زمینه شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره انجام شده است. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعه ابوعامر و همکاران در مورد تجزیه بیولوژیکی دیازینون توسط سویه Serratia marcescens DI۱۰۱ مورد

مقایسه قرار گرفت.نتایج مطالعه نشان داد سراشیا قابلیت تجزیه بالایی دارد و در مدت ۱۶ روز، بالای ۹۵٪ سم را تجزیه کرد. در مطالعه حاضر نیز سراشیا در محیط خاک، بالای ۹۰٪ تخریب را داشت.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر مانند تمام تحقیقات در این زمینه، با هدف کاهش آلودگی ناشی از سموم توسط عوامل میکروبی انجام شد، با این تفاوت که هم زمان درصد تجزیه در محیط مایع و خاک بررسی گردید. نتایج نشان داد که باکتری‌ها، قابلیت سازگاری با دیازینون را دارند. با توجه به نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی، هر دو باکتری سراشیا و انتروباکتر قابلیت تجزیه و مصرف دیازینون را به‌عنوان منبع کربن داشتند، در نتیجه آلودگی حاصل از آفت‌کش‌ها مانع رشد باکتری در محیط‌های آلوده نشد و باکتری‌ها از آفت‌کش در محیط‌های غذایی ضعیف به‌عنوان منبع انرژی استفاده کردند. هر دو باکتری در محیط خاک قابلیت تجزیه بیشتری نسبت به محیط مایع داشت. جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های موردنظر به‌عنوان سویه توانمند در تجزیه دیازینون و سایر سموم ارگانوفسفره می‌تواند کاندیدای بالقوه برای پاک‌سازی زیستی خاک و آب آلوده معرفی شود، زیرا قابلیت رشد در غلظت بالای آفت‌کش را دارد. مطالعات بیشتری برای بررسی کاربرد بالقوه باکتری‌ها برای پاک‌سازی زیستی محیط‌های آلوده به دیازینون مورد نیاز است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند. همچنین هرگونه تضاد منابع حقیقی یا مادی که ممکن است بر نتایج یا تفسیر مقاله تأثیر بگذارد را رد می‌کنند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دکترا با کد طرح ۱۶۲۲۹۰۸۴۶ می‌باشد. بدین‌وسیله از کارکنان و مسئولین آزمایشگاه میکروبیولوژی و باکتری‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به‌دلیل حمایت‌هایی که در جهت انجام این تحقیق داشتند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Esfandian H. Removal of Organophosphorus insecticide Diazinon from aqueous solution by synthetic zeolite sodalite.[Doctorate Thesis]. Iran.Faculty of Chemical Engineering, Gas and Petroleum, Semnan University; 2016. (Persian)
2. Ghanbari F, Monavari M, Moattar F. Compare Diazinon Concentrations in Soil Sample of Different Area of Rice Paddies in Rasht. fourth international conference on new findings in agricultural sciences,natural resources and environment 2018. (Persian)
3. Liu T, Xu S, Lu S, et al. A review on removal of organophosphorus pesticides in constructed wetland: performance, mechanism and influencing factors. Science of The Total Environment 2019;651:2247-2268.
4. Zhao M-a, Gu H, Zhang C-J, et al. Metabolism of insecticide diazinon by Cunninghamella elegans ATCC36112. RSC advances 2020;10(33):19659-19668.
5. Aswathi A, Pandey A, Sukumaran RK. Rapid degradation of the organophosphate pesticide–Chlorpyrifos by a novel strain of Pseudomonas nitroreducens AR-3. Bioresource technology 2019;292:122025.
6. Hassanshahian M. Isolation and characterization of diazinon degrading bacteria from contaminated agriculture soils. Iranian Journal of Toxicology 2016;10(4):13-20.
7. Amani F, Safari Sinegani AA, Ebrahimi F, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and diazinon organophosphates by two bacteria isolated from contaminated agricultural soils. Biological Journal of Microorganism. 2018;7(28):27-39.
8. Hamad MTMH. Biodegradation of diazinon by fungal strain Apergillus niger MK640786 using response surface methodology. Environmental Technology & Innovation 2020;18:100691.
9. Alipour A, Alizadeh A, Khodaygan P. Evaluation of diazinon pesticide biodegradation by isolated indigenous bacteria from contaminated soil. Biological Journal of Microorganism 2018;7(26):73-86.(Persian)
10. Shabbir M, Singh M, Maiti S, et al. Removal enactment of organo-phosphorous pesticide using bacteria isolated from domestic sewage. Bioresource technology 2018;263:280-288.

11. Szewczyk R, Rozalska S, Mironenka J, et al. Atrazine biodegradation by mycoinsecticide Metarhizium robertsii: Insights into its amino acids and lipids profile. Journal of environmental management 2020;262:110304.
12. Fattahi E, Ostovar N, Kaboosi H. Isolation and Characterization of Chlorpyrifos-Degrading Bacteria from Rice Field Soils in Amol City, Iran. Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research. 2017;15(1):73-82.(Persian)
13. Nasrollahi M, Pourbabaei AA, Etesami H, et al. Diazinon degradation by bacterial endophytes in rice plant (Oryzia sativa L.): a possible reason for reducing the efficiency of diazinon in the control of the rice stem–borer. Chemosphere2020;246:125759.
14. Briceño G, Schalchli H, Mutis A, et al. Use of pure and mixed culture of diazinon-degrading Streptomyces to remove other organophosphorus pesticides. International Biodeterioration & Biodegradation 2016;114:193-201.
15. Ebadi T, Najafpour GD, Younesi H, et al. Rapid biodegradation of diazinon using a novel strain of Candida pseudolambica. Environmental Technology & Innovation 2022;25:102218.
16. Mostafa AA-F, Yassin MT, Dawoud TM,et al. Mycodegradation of diazinon pesticide utilizing fungal strains isolated from polluted soil. Environmental Research 2022;212:113421.
17. Wang G, Liu Y. Diazinon degradation by a novel strain Ralstonia sp. DI-3 and X-ray crystal structure determination of the metabolite of diazinon. Journal of biosciences. 2016;41(3):359-66.
18-Panda J, Kanjilal T, Das S. Optimized biodegradation of carcinogenic fungicide Carbendazim by Bacillus licheniformis JTC-3 from agro-effluent. Biotechnology Research and Innovation. 2018;2(1):45-57.
19. Wang G, Li X, Zheng J, et al. Isolation of a diazinon-degrading strain Sphingobium sp. DI-6 and its novel biodegradation pathway. Frontiers in Microbiology.2022;13.
20. Ghafari M, Hassanshahian M, Mahani M. Isolation and characterization of Fenitrothion-degrading bacteria from pestachio gardens in Kerman Provinance. Biological Journal of Microorganism. 2014;3(10):51-64.(Persian)
21. Sasikala C, Jiwal S, Rout P, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2012;28(3):1301-1308.
22. Abo-Amer AE. Biodegradation of diazinon by Serratia marcescens DI101 and its use in bioremediation of contaminated environment. Journal of microbiology and biotechnolog 2011;21(1):71-80.
23. Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine pollution bulletin 2012;64(1):7-12.