جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده علف‌کش پاراکوات از خاک‌های تبریز

سیده شمسی هاشمی[1]، ناصر علی‌اصغرزاد، رضا خاک‌ور و شاهین اوستان

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشگاه تبریز؛ **hashemi_shamsi@yahoo.com**

استاد گروه علوم خاک، دانشگاه تبریز؛ **n-aliasghar@tabrizu.ac.ir**

استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه تبریز؛ **khakvar@gmail.com**

دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه تبریز؛ **oustan@hotmail.com**

دریافت: **93/3/25** و پذیرش: **94/5/12**

چکیده:

علف‌کش پاراکوات از سموم پرمصرف با کاربرد بسیار وسیع جهت کنترل علف‌های هرز می‌باشد. پاراکوات سمی نسبتاً پایدار با نیمه‌عمر بالا در خاک است. یکی از روش‌های مؤثر در حذف و کاهش اثرات مخرب پاراکوات از محیط زیست، تجزیه زیستی است. در پژوهش حاضر، جدایه‌های باکتری از خاک مزارع اطراف تبریز با سابقه مصرف آفت‌کش‌ها جداسازی شدند. کارآیی سویه‌ها، در ارلن‌های دارای محیط کشت مایع حداقل (MSM)، حاوی 0، 25، 50، 75 و 100 از پاراکوات به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی و همچنین در حضور منبع کربنی گلوکز (1%w/v) انجام شد و پاراکوات باقیمانده بعد از 30 روز انکوباسیون در طول موج 396nm اندازه‌گیری شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. و از بین جدایه‌های جمع‌آوری شده دو جدایه با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی (16S rRNA) شناسایی شده و *Achromobacter xylosoxidans* و *Streptomyces* sp. نامگذاری گردیدند. این باکتری‌ها به ترتیب در غلظت 50ppm پاراکوات و در عدم حضور گلوکز دارای توان تجزیه زیستی 47 و 40/667% بودند در حالی‌که با افزودن گلوکز این توان به ترتیب به 74/533 و 70/267% افزایش یافت. این باکتری‌ها توانستند در حضور غلظت‌های مختلف پاراکوات رشد نموده و تجزیه زیستی پاراکوات به‌طور معنی داری نسبت به شاهد توسط این جدایه‌ها افزایش یافت. حضور گلوکز باعث افزایش بیشتر رشد باکتری‌ها و افزایش معنی‌دار تجزیه زیستی توسط جدایه‌های باکتریایی در مقایسه با عدم حضور گلوکز شد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، تجزیه زیستی، *Achromobacter xylosoxidans*، *Streptomyces* sp.

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: تبریز، دانشگاه تبریز-دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

مقدمه

آفت کش[1]ها طیف گسترده ای از ترکیبات شیمیایی هستند که به طور وسیع برای محافظت گیاهان در مقابل آفات و بیماری‌ها و هر عامل کاهش دهنده محصولات کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند (آریاس-استوز و همکاران، 2008). در سیستم‌های کشاورزی پیشرفته، استفاده از آفت‌کش‌ها غیر قابل اجتناب است، ولی مشکل اساسی در مورد مصرف آفت‌کش‌ها، بقایای آفت‌کش‌ها در محیط بوده که اثرات جانبی زیادی را بر سلامت موجودات زنده و میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌های مختلف داشته و همچنین پس از ورود به زنجیره‌های غذائی، سلامت انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (رائو و همکاران، 1993؛ چوداری و همکاران، 2008).

به دلیل گستردگی و تنوع بالای علف‌های هرز، استفاده از علف‌کش[2]ها به‌طور گسترده ای مورد توجه زارعان و کشاورزان قرار گرفته است (پترسون و همکاران، 2001). با گذشت سالیان، علف‌کش پاراکوات[3] به‌دلیل خواص منحصر به فرد در میان مواد شیمیایی کشاورزی در جهان محبوب‌ترین بوده و از سموم پر-مصرف با کاربرد بسیار گسترده می‌باشد. پاراکوات با نام تجاری گراماکسون[4] (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium) از گروه بی‌پیریدینیوم[5] می‌باشد (رافائل منک و مائوریکو، 2010).

پاراکوات دارای حلالیت زیاد،گرم در لیتر 700 در آب و نیمه‌عمر[6] 1000روز تا 6/6 سال در خاک می‌باشد (هنس و همکاران، 1980؛ سیمپسون و همکاران، 2001). یون‌های آن با نیروی زیادی توسط ذرات خاک جذب و باعث بی‌تحرکی آن در خاک و عدم دسترسی از نظر بیولوژیکی می‌شود (گیلیلند، 2004). نیمه‌عمر بالای آن در مقایسه با سایر علف‌کش‌ها، باعث ماندگاری طولانی مدت آن در خاک شده و در نتیجه تأثیر منفی بر سیستم زیستی خاک و بیوماس میکروبی دارد (پن خورست، 2006).

در گزارشاتی توسط محققان اعلام شده که مصرف مکرّر پاراکوات برای سال‌های متمادی باعث کاهش گره‌بندی لگوم‌ها (یوه و هانسلی، 1993؛ کوپمن و همکاران، 1995) و تنفس خاک (گوپتا و همکاران، 2000) شده است، همچنین اثر منفی بر ساختار میکروبی خاک و کاهش ظرفیت تجزیه زیستی (دوآه-ینتامی و همکاران، 1986؛ پن خورست، 2006) را موجب شده است. پاراکوات بیش‌ترین سمیّت را برای انسان داشته و حتی باعث مرگ می‌شود (آلمدا و همکاران، 2010).

روش‌های متعددی جهت پاک‌سازی، حذف و کاهش آلاینده‌ها وجود دارد از جمله روش‌های فیزیکی، بیولوژیکی، حرارتی و شیمیایی می‌باشد (مروترا و همکاران، 1996؛ ونزل، 2008). از بین روش‌ها، روش تجزیه زیستی با استفاده از توانایی میکروارگانیسم‌های موجود در طبیعت بسیار مورد توجه بوده و امروزه جزء روش‌های برگزیده جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده می‌باشد (انیفید و ابوبکر، 2007). زیست‌پالایی یک اصطلاح کلی جهت حذف و کاهش آلودگی محیط‌زیست با فرآیندهای بیولوژیکی و استفاده از موجودات زنده و میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومایست‌ها، سیانوباکترها، جلبک‌ها و مخمرها در خاک‌ها و آب‌های آلوده می‌باشد (لیونگ، 2004). هر چه میزان حذف آلاینده توسط یک میکروارگانیسم بیشتر باشد، آن میکروارگانیسم از نظر بیوتکنولوژی ارزشمند می‌باشد (اتینیو ولوپز، 2005؛ زانگ یانگ، 2007).

در گزارشات متعددی به استفاده از میکروارگانیسم های خاکزی جهت تجزیه زیستی انواع آفت‌کش‌ها (پن خورست و همکاران، 1995؛ سیکون و همکاران، 2009)، انواع پسماندهای شیمیایی (سیگر و همکاران، 2010) و کشاورزی (ساتر، 2009) اشاره شده است، همچنین گزارش شده که طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها، قارچ ها، اکتینومایست‌ها و...) در خاک حضور دارند که قادر به تجزیه پاراکوات می‌باشند (سامرز، 1980؛ ریکتس، 1999). از میان گونه‌های مختلف، گونه *Lipomyces starkeyi* از جمله گونه‌هایی است که بررسی‌های فراوانی بر روی آن از جهت توان تجزیه زیستی پاراکوات انجام گرفته است (اسمیت و لیون، 1976؛ کر و همکاران، 1985).

برنز و آئودوس (1970) و اندرسون و دریو (1972) گزارش کرده اند که گونه *Lipomyces starkeyi* قادر به استفاده از پاراکوات به‌عنوان منبع نیتروژن می‌باشد، این تجزیه در شرایط هوازی در محدوده گسترده‌ای از pH و دما انجام می‌شود. فاندربوک (1969) گزارش کرد که مخمر *Lipomyces starkeyi* فقط در شرایط هوازی قادر به تجزیه پاراکوات می‌باشد. کر و همکاران (1985) نشان دادند که (این گونه در شرایط بی‌هوازی و در عدم حضور یک منبع کربنی سهل‌الوصول ناتوان در رشد و تجزیه پاراکوات می‌باشد) این گونه قادر به تجزیه حلقه کربنی پاراکوات به بیش از 80% بوده و مقدار پاراکوات تجزیه

1. Pesticides
2. Herbicide
3. Paraquat
4. Qramoxone
5. Bipyridylium
6. Half- life

شده از طریق اندازه‌گیری میزان دی‌اکسیدکربن تولیدی به دست آمده بود. بالدوین و همکاران (1966) مشاهده کرده‌اند که گونه *Lipomyces starkeyi* در محیط حاوی پاراکوات مقاوم بوده و قابل تکثیر می‌باشد و با نشاندار کردن کربن حلقه پاراکوات مشاهده کردند که کربن این حلقه به‌عنوان منبع کربن مورد استفاده این گونه بوده و به‌صورت دی‌اکسیدکربن (82 تا 84%) از محیط آلوده آزاد شده است.

در بررسی‌های گوناگون از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده پاراکوات مانند *Corynebacterium fascians*، *Clostridium pasteurianum* و *Lipomyces starkeyi* در محیط‌های آلوده نام برده شده است (اسمیت و لیون، 1976). بالدوین و همکاران (1966) مشاهده کردند که *Clostridium pasteurianum* در شرایط هوازی و بی‌هوازی توانایی تجزیه پاراکوات را دارد. اسمیت و همکاران (1976) مشاهده کردند که با افزایش غلظت پاراکوات وزن ماده خشک تولیدی توسط قارچ *Aspergillus niger* کمتر از 50% کاهش می‌یابد و در قارچ‌های *Penicillium frequentans*، *Aspergillus niger* این کاهش بیش از50% می‌باشد. سلول‌های *Escherichia coli* نسبت به پاراکوات غیرقابل نفوذ بوده و در حضور پاراکوات قادر به رشد می‌باشند (جونز و همکاران، 1976؛ جونز و گارلند، 1977). باکتری *Ochrobctru anthropi* JW2 می‌تواند در محیط حاوی پاراکوات رشد و تکثیر کند، وون و همکاران (2001) این توانایی را در این باکتری به علت حضور یک سری ژن‌های مقاوم به این علف‌کش دانسته‌اند. همچنین بوزارت و فاندربوک (1966) جهت بررسی توان رشد *Pseudomonas* sp. متوجه شدند که حضور پاراکوات تا غلظت 1000 ppm تأثیری بر روی جذب اکسیژن و تنفس سلول‌ها ندارد. کپیتکو و همکاران (2002) جهت بررسی توان تجزیه پاراکوات توسط *P. putida* در زمان‌های مختلف و در حضور و عدم حضور منبع کربنی پرداخته و مشاهده کردند که در حضور منبع کربنی ساده قادر به تجزیه بیش از 95% از پاراکوات می‌باشد و با گذشت زمان درصد تجزیه توسط این باکتری افزایش می‌یابد، به‌طوریکه درصد تجزیه از 38/59% در روز اول به 41/32% در روز دوم افزایش یافته بود.

جهت کاهش اثرات زیان‌بار آفت‌کش‌ها، استفاده از میکروارگانیسم‌های خاک در تجزیه زیستی، جداسازی گونه‌های دارای توانایی بالا، شناسایی و بررسی توانایی آن‌ها مورد توجه می‌باشد. از آنجا که میکروارگانیسم‌های متفاوتی در خاک زندگی می‌کنند که دارای توان تجزیه و استفاده از سموم و آفت‌کش‌ها به‌عنوان منبع تغذیه‌ای می‌باشند، لذا این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های خاکزی بومی دارای توان بالا و تلاش برای گزینش گونه‌های برتر در تجزیه پاراکوات و بررسی اثر حضور منبع کربنی گلوکز بر میزان تجزیه توسط آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و تهیه سوسپانسیون خاک

تعداد20 نمونه خاک جهت انجام آزمایش از خاک مزارع اطراف تبریز با سابقه مصرف آفت‌کش‌ها (آفت کش هایی از قبیل: بنومیل، دودین، زینب، کاربندازیم، مانکوزب، دیازینون و...)تهیه شد. نمونه برداری از سطح خاک با کنار زدن لایه نازک سطحی به دلیل حضور مواد-آلی انجام شد سپس برای هر نمونه خاک سری رقت خاک[1] تا رقت 10^{-3} با چهار تکرار تهیه شدند.

کشت غنی‌سازی میکروب[2]ها

مقادیر کافی محیط‌کشت معدنی (MSM[3]) حاوی ترکیبات (گرم در لیتر): 2 گرم $(NH_4)_2SO_4$، 0/2گرم $MgSO_4.7H_2O$، 0/01گرم $CaCl_2.2H_2O$، 0/001گرم $FeSO_4.7H_2O$، 1/5 گرم $Na_2HPO_4.12H_2O$، 1/5 گرم KH_2PO_4، pH نهایی برابر7/2 (سیکون و همکاران، 2009) تهیه شد.

مرحله کشت غنی‌سازی میکروب‌ها جهت جداسازی اولیه میکروارگانیسم‌های توانا در تجزیه پاراکوات انجام شد. در این مرحله پاراکوات تجارتی با غلظت 50 میلی-گرم بر لیتر به محیط‌کشت معدنی مایع (سیکون و همکاران، 2009) اضافه شد، سپس یک میلی‌لیتر از تمام رقت‌های تهیه شده به محیط‌کشت داخل ارلن‌مایرها در چهار تکرار اضافه شد و تمام نمونه‌ها در دمای 26-27°C در شیکرانکوباتور با چرخش 120 دور در دقیقه تا زمانی که نشانه‌هایی از رشد میکروارگانیسم‌ها ظاهر شود (24 تا 96 ساعت) قرار داده شدند. تمام این مراحل برای هر 20 نمونه خاک انجام شد، و در پایان آزمایش 40 کلنی رشد کرده بودند. از بین این 40 نمونه: 4 نمونه در 24 ساعت، 6 نمونه در 36 ساعت، 5 نمونه در 48 ساعت، 6 نمونه در 72 ساعت، 9 نمونه در 84 ساعت و 10 نمونه در 96 ساعت نشانه‌هایی از رشد میکروارگانیسم‌ها ظاهر شد.

جداسازی و خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها

پاراکوات با غلظت نهایی 100 میلی‌گرم بر لیتر (سیکون و همکاران، 2009) به محیط‌کشت معدنی جامد

---

1. Serial dilution
2. Enrichment culture
3. Mineral Salt Medium

(آگار اضافه شده به محیط‌کشت معدنی) اضافه شد، سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی حاصله از مرحله کشت غنی‌سازی بر روی پلیت‌های این محیط-کشت با چهار تکرار کشت داده شد و در دمای ^{o}C 27-26 به مدت 36 ساعت در انکوباتور نگه‌داری شد تا کلنی‌های تواناتر رشد یابند. در این مرحله با توجه به اینکه غلظت پاراکوات مورد استفاده کمتر از مرحله قبل-کشت غنی‌سازی میکروب‌ها- بود تمام 40 نمونه جداسازی شده از مرحله قبل رشد یافته بودند در ابتدا تعداد 20 کلنی جداسازی شدند و تعدادی به دلیل شباهت‌های ظاهری حذف شدند و در نهایت 10 جدایه انتخاب شد

جداسازی میکروارگانیسم‌هایی با توان درصد تجزیه بالای پاراکوات نسبت به بقیه نمونه‌ها برای آزمایش اصلی

ابتدا از 10 جدایه انتخابی مرحله قبل، در محیط‌کشت نوترینت‌براث سوسپانسیون میکروبی تهیه و در شیکر-انکوباتور با چرخش 120 دور در دقیقه قرار داده شد، بعد از رسیدن OD_{600}[1] آنها به 0/7(جمعیت باکتری که به نمونه افزوده می‌شود باید حدود 10^7 تا 10^8 باشد و بر اساس جدول استاندارد مک فارلند دانسیته نوری 0/7 معادل این جمعیت است)، 100میکرولیتر از هر جدایه برای تلقیح به محیط‌کشت معدنی مایع حاوی پاراکوات با غلظت 60 میلی‌گرم بر لیتر با پنج تکرار افزوده شد. به این ترتیب جمعیت تلقیح برای تیمارها یکسان بود (چون OD_{600} هر جدایه در 0/7برای هر جدایه انتخاب شد، اضافه کردن حجم یکسان از هر جدایه (100میکرولیتر) در هر نمونه باعث ایجاد جمعیت یکسان در هر ارلن مورد آزمایش می‌شود). نمونه‌ها در شیکرانکوباتور با چرخش 120 دور در دقیقه قرار داده شدند. تمام این مراحل در حضور گلوکز با غلظت نهایی 1w/v% (سیکون و همکاران، 2009) عبوری از فیلتر استریل (0/22µm) در محیط کشت معدنی نیز انجام شد و مقدار باقی‌مانده از پاراکوات در 10، 20، 30 و 40 روز بعد از قرار دادن در شیکرانکوباتور در حضور و عدم حضور گلوکز اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری پاراکوات باقی‌مانده در نمونه‌ها

بعد از مدت زمان‌های تعیین شده در مرحله قبل، نمونه‌ها را در لوله‌های سانتریفیوژ ریخته و به مدت 5 دقیقه با چرخش 6000 دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و از روش نپل، کونتوم و همکاران جهت اندازه‌گیری پاراکوات باقی‌مانده در نمونه‌ها و شاهدها مورد استفاده قرار گرفته شد (نپل، 1977؛ کونتوم و همکاران، 1999). شدت رنگ آبی تولیدی با گذشت زمان کاهش یافته و بعد از گذشت 12 ساعت محلول‌ها کاملاً بی‌رنگ خواهند شد.

جهت کالیبراسیون اسپکتروفتومتر، استانداردهای پاراکوات 99/9 درصد (تهیه شده از شرکت-Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH) با غلظت‌های 0، 2، 4، 6، 8، 10 میلی‌گرم بر لیتر در محیط‌کشت معدنی در عدم حضور و حضور گلوکز با غلظت نهایی 1w/v% عبوری از فیلتر استریل (0/22µm) تهیه شدند و بقیه مراحل مانند نمونه‌ها انجام شد.

تمام مراحل بالا در روزهای 10، 20، 30 و 40 روز پس از قرار دادن در شیکرانکوباتور برای تمام نمونه‌ها انجام و مقدارهای پاراکوات باقی‌مانده به‌دست آمد. در پایان این مرحله دو میکروارگانیسم با توان تجزیه‌ای بالا در حضور گلوکز (اضافه کردن گلوکز با غلظت 1w/v% به نمونه ها+جدایه مورد نظر+ پاراکوات با غلظت مورد آزمایش از پاراکوات) وعدم حضور گلوکز (جدایه مورد نظر+ پاراکوات با غلظت مورد آزمایش بدون اضافه کردن گلوکز) با نام‌های انتخابی SH-1 و SH-2 برای انجام آزمایش‌های اصلی انتخاب شدند و بین مدت 30 تا 40 روز تفاوت معنی‌دار در مقدار و درصد تجزیه پاراکوات مشاهده نگردید ولی تفاوت معنی‌داری در مقدار و درصد تجزیه پاراکوات در 20 تا 30 روز مشاهده شد، پس زمان مناسب برای تجزیه پاراکوات 30 روز انتخاب گردید.

تعیین کمّی پتانسیل تجزیه آفت‌کش‌ها توسط جدایه‌های میکروبی

از پاراکوات غلظت‌های 0، 25، 50، 75، 100 میلی‌گرم بر لیتر در محیط‌کشت معدنی با سه تکرار تهیه شد. سپس 100 میکرولیتر از دو جدایه میکروبی (بعد از رسیدن OD_{600} آنها به 0/7) در عدم حضور و حضور گلوکز با غلظت نهایی 1w/v% عبوری از فیلتر استریل (0/22µm) اضافه گردید. تیمارهای شاهد فاقد باکتری، همانند روش فوق‌الذکر آماده شده و فقط باکتری به آنها اضافه نگردید. نمونه‌ها به مدت 30 روز در شیکرانکوباتور با چرخش 120 دور در دقیقه قرار داده شد.

خالص‌سازی و شناسایی باکتری‌ها

دو جدایه مؤثر در تجزیه پاراکوات، با به‌کارگیری مشاهدات میکروسکوپی، تست‌های بیوشیمیائی (کلمنته و همکاران، 1990؛ شاد و همکاران، 2001) و روش‌های مولکولی شناسائی شدند. برای شناسایی مولکولی باکتری-ها به روش توالی‌یابی 16S rRNA با استفاده از

[1] Optical Density

آغازگرهای[1] عمومی 8F و 1492R انجام شد (جدول 1). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) از استخراج DNA ژنومیک میکروبی (سامبروک و راسل، 2001) استفاده شد.

برنامه PCR به‌کار رفته دارای 30 چرخه بود. چرخه اولیه با دمای 95°C به مدت 2 دقیقه به منظور از هم باز شدن[2] DNA ژنومی استفاده گردید. 30 سیکل بعدی با دمای 94°C به مدت 30 ثانیه، دمای اتصال[3] آغازگر با توجه به دمای اتصال آنها (40°C) به مدت 30 ثانیه و دمای بسط شدن[4] 72°C به مدت 1 دقیقه تکرار شد و در پایان یک چرخه اضافی بسط شدن به مدت 10دقیقه و دمای تکثیر 72°C دنبال گردید که در دستگاه ترموسایکلر Corbett انجام گردید. محصولات PCR به‌وسیله الکتروفورز افقی روی ژل آگاروز به غلظت 1% رنگ آمیزی شده با محلول اتیدیوم بروماید در ولتاژ 100 ولت و 23 آمپر به مدت 1ساعت انجام شد و نوارهای پدیدار شده (1500bp) با دستگاه ژل داکیومنت از آن عکس برداری شد. سپس جهت توالی‌یابی به شرکت کیاژن کره جنوبی ارسال و توالی‌یابی شدند پس از توالی‌یابی نمونه-ها، توالی‌های مورد نظر در پایگاه اطلاعاتی NCBI[5]، Blast-n[6] شدند.

بعد از جداسازی 2 جدایه برتر، آزمایش نهایی به-صورت فاکتوریل با سه فاکتور الف) غلظت آفت‌کش در پنج سطح، ب) جدایه باکتری در سه سطح (دو جدایه و شاهد بدون باکتری) و ج) گلوکز در دو سطح با و بدون گلوکز، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی جدایه‌ها

در نهایت با توجه به نتایج تست‌های بیوشیمیایی و خصوصیات مورفولوژیکی (جدول 2) و آنالیز مولکولی جدایه SH-1 به‌عنوان *Streptomyces* sp. (ترسنر و همکاران، 1968؛ کوتزنر، 1986) و جدایه SH-2 به‌عنوان *Achromobacter xylosoxidans* (مک گاکن و همکاران، 1982؛ یانگ و همکاران، 2007؛ الارجی و علی، 2013) شناسائی شدند.

تجزیه پاراکوات در عدم حضور گلوکز

تجزیه پاراکوات در محیط کشت معدنی (MSM) زمانی‌که پاراکوات تنها به‌عنوان منبع تغذیه-چون محیط کشت معدنی حاوی حداقل مواد لازم برای رشد باکتری‌ها می‌باشد، خضور پاراکوات منبع تغذیه‌ای به‌شمار می‌رود- برای باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد که اثر هر دو فاکتور باکتری و غلظت‌های پاراکوات بر مقدار تجزیه پاراکوات و همچنین اثر متقابل آنها نیز معنی‌دار می‌باشد (p<0/01)، (جدول 3). با توجه به شکل (2-الف)، هر دو باکتری *A. xylosoxidans* و *Streptomyces* sp. درصد پاراکوات تجزیه شده را نسبت به تیمارهای بدون باکتری (شاهد) در تمام غلظت‌های پاراکوات مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری افزایش دادند (p<0/01). البته، با افزایش غلظت پاراکوات مصرفی، درصد تجزیه زیستی پاراکوات توسط هر دو باکتری کاهش یافته است که نشان‌دهنده کاهش توانایی هر دو باکتری در تجزیه زیستی با افزایش غلظت پاراکوات مصرفی می‌باشد. به‌طوری‌که در باکتری *Streptomyces* sp. درصد تجزیه از 51/333% در غلظت 25 میلی‌گرم بر لیتر به 29/1% در غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر و در باکتری *A. xylosoxidans* از 47/4% در غلظت25 میلی‌گرم بر لیتر به 24/833% در غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافته است. باکتری *Streptomyces* sp. نسبت به *A. xylosoxidans* در تمامی غلظت‌های پاراکوات، در تجزیه زیستی تواناتر بود. در تیمارهای بدون باکتری (شاهد) به دلیل عدم حضور باکتری، تجزیه پاراکوات فقط شامل تجزیه شیمیایی پاراکوات بود.

تجزیه پاراکوات در حضور گلوکز

تجزیه پاراکوات در محیط کشت معدنی زمانی‌که علاوه بر پاراکوات، گلوکز نیز به‌عنوان منبع تغذیه برای باکتری‌های مورد آزمایش بود، نشان داد که اثر هر سه فاکتور باکتری، غلظت پاراکوات و حضور گلوکز بر مقدار تجزیه پاراکوات و همچنین اثر متقابل آنها نیز معنی‌دار می‌باشد (p<0/01)، (جدول 3). با توجه به شکل (2-ب) هر دو باکتری *Streptomyces* sp. و *A. xylosoxidans* درصد پاراکوات تجزیه شده را نسبت به تیمارهای بدون باکتری (شاهد) در تمام غلظت‌های پاراکوات مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری افزایش دادند (p<0/01). البته، با افزایش غلظت پاراکوات مصرفی در حضور گلوکز، درصد تجزیه زیستی پاراکوات توسط هر دو باکتری کاهش یافته است، که نشان‌دهنده کاهش توانایی هر دو باکتری در تجزیه زیستی با افزایش غلظت پاراکوات مصرفی می‌باشد. با توجه به نتایج، باکتری *Streptomyces* sp. نسبت به *A. xylosoxidans* در تمامی غلظت‌های

---

1. Primers
2. Denaturation
3. Annealing
4. Extention
5. National center for biotechnological information
6. Basic local alignment search tool (for nucleotide)

پاراکوات در حضور گلوکز، در تجزیه زیستی تواناتر می‌باشد. در تیمارهای بدون باکتری (شاهد) به دلیل عدم حضور باکتری، تجزیه پاراکوات فقط شامل تجزیه شیمیایی پاراکوات می‌باشد. به‌طوری‌که درصد تجزیه از 90/533% در غلظت 25 میلی‌گرم بر لیتر به 45/2% در غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر در باکتری *Streptomyces* sp. و از 81/6% در غلظت 25 میلی‌گرم بر لیتر به 39/667% در غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر در باکتری *A. xylosoxidans* کاهش یافته است (شکل2-ب). باکتری *Streptomyces* sp. نسبت به *A. xylosoxidans* در تمامی غلظت‌های پاراکوات، در تجزیه زیستی تواناتر می‌باشد. در تیمارهای بدون باکتری (شاهد) به دلیل عدم حضور باکتری، تجزیه پاراکوات فقط شامل تجزیه شیمیایی پاراکوات حتی در حضور گلوکز می‌باشد.

همچنین مشاهده شده که مقدار تجزیه شیمیایی (غیر-زیستی) در عدم حضور گلوکز در بدون باکتری (شاهد) بیشتر از حضور گلوکز می‌باشد که احتمالاً این کاهش به علت حضور گلوکز و مانعی بر واکنش‌های شیمیایی انجام یافته می‌باشد.

بحث

گزارشات متعددی از توانایی باکتری‌ها در تجزیه زیستی آفت‌کش‌ها و دیگر مواد آلاینده وجود دارد و این توان تجزیه زیستی را می‌توان در حضور مواد کربنی افزایش داد (کالوانیسکا و همکاران، 2008؛ سیکون و همکاران، 2009). برخی محققین علت این افزایش تجزیه را به تأثیر حضور مواد سهل‌الوصول کربنی بر افزایش جمعیت باکتری‌های مورد آزمایش نسبت داده‌اند (سیکون و همکاران، 2009).

به‌نظر می‌رسد که با استفاده از این باکتری‌ها در حضور مواد کربنی قابل دسترس موجود در منطقه از قبیل ملاس چغندرقند- ساکارز کل 48%، تفاله‌های نیشکر- ساکارز کل 46%-(سرتین، 1983)، نیشکر-12 تا 16% ساکارز محلول-(دیلیجن، 1952)، بقایای مواد غذایی و غیره به-همراه مایه تلقیح‌های مناسب، آب و ایجاد شرایط محیطی مناسب جهت پاک‌سازی در خاک می‌توان تجزیه این سموم را در خاک تشدید کرده و از اثرات مخرب زیست محیطی آنها کاست.

در بررسی توان تجزیه سویه‌های مختلف باکتری *Achromobacter xylosoxidans* مشاهده شد که تجزیه 2,4-D توسط سویه EST4002 (ودلر و همکاران، 2000)، تجزیه بی‌فنول[1] توسط سویه B-16 (زنگ و همکاران، 2007)، تجزیه اندوسولفان توسط سویه C55 (لی و همکاران، 2009) تجزیه 2-chlorobenzoate و 2,5-dichlorobenzoate توسط سویه A8 (استراند و همکاران،2011) انجام می‌گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که به‌طور طبیعی میکروارگانیسم‌هایی در خاک حضور دارند که دارای توانایی بالا در تجزیه پاراکوات می‌باشند. البته توانایی این میکروارگانیسم‌ها در حضور یک منبع کربنی سهل‌الوصول بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. استفاده از میکروارگانیسم‌ها جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده روش مناسبی می‌باشد و امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است. گزارشات نشان داده که طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها، قارچ ها، اکتینومایست‌ها و...) در خاک حضور دارند که قادر به تجزیه پاراکوات می‌باشند (سامرز، 1980؛ ریکتس، 1999). از میان میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده پاراکوات، گونه *Lipomyces starkeyi* (برنز و آئودوس، 1970؛ اندرسون و دریو، 1972؛ اسمیت و لیون، 1976؛ کر و همکاران، 1985)، *Corynebacterium fascians*، *Clostridiumpasteurianum* (اسمیت و لیون، 1976) گزارش شده است.

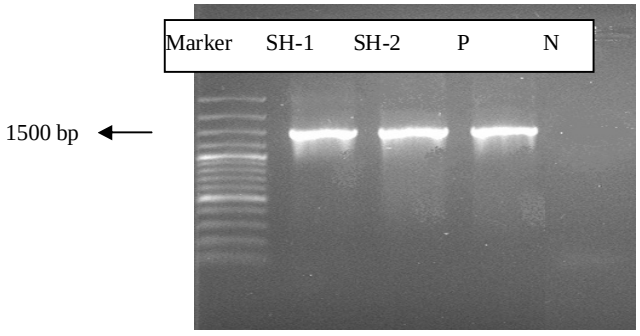
با توجه به نتایج حاصله از این آزمایش، مشاهده گردید که میکروارگانیسم‌ها قادر به تجزیه پاراکوات بوده و البته توانایی این میکروارگانیسم‌ها در تجزیه متفاوت می‌باشند و جداسازی و شناسایی جدایه‌ها با پتانسیل تجزیه‌ای بالاتر مقرون به صرفه بوده و در کاهش بیشتر اثرات مخرب مصرف پاراکوات مؤثرتر می‌باشند. با توجه به اشکال (2:الف-ب)، هر دو باکتری *Streptomyces* sp. و *A. xylosoxidans* باعث افزایش قابل توجه درصد تجزیه پاراکوات نسبت به بدون باکتری (شاهد) در حضور و عدم حضور گلوکز شده‌اند. حضور گلوکز به‌عنوان یک منبع کربنی باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در تجزیه پاراکوات در هر دو باکتری *Streptomyces* sp. و *A. xylosoxidans* نسبت به عدم حضور گلوکز شده است. بررسی اثرات تحریکی حضور گلوکز بر افزایش میزان تجزیه نسبت به عدم حضور گلوکز را می‌توان به منبع انرژی سهل‌الوصول (گلوکز) برای باکتری‌ها نسبت داد به‌طوری‌که حضور آن باعث افزایش در تجزیه پاراکوات می‌شود. البته با توجه به نتایج، باکتری *Streptomyces* sp. نسبت به *A. xylosoxidans* در تمامی غلظت‌های پاراکوات قدرت تجزیه بالاتری را نشان داد.

1. Biphenol

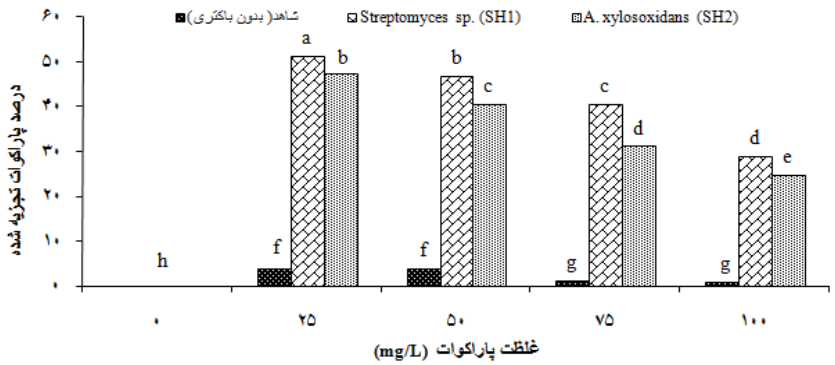
با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، استفاده از روش‌های مولکولی جهت شناسایی و بررسی ژن‌های عامل تجزیه در این باکتری‌ها و بررسی تجزیه میکروبی این سموم در حضور و عدم حضور سایر عناصر غذایی مهم مثل فسفر، نیتروژن و غیره پیشنهاد می‌شود.

جدول 1- آغازگرهای عمومی 16S rRNA استفاده شده درانجام PCR

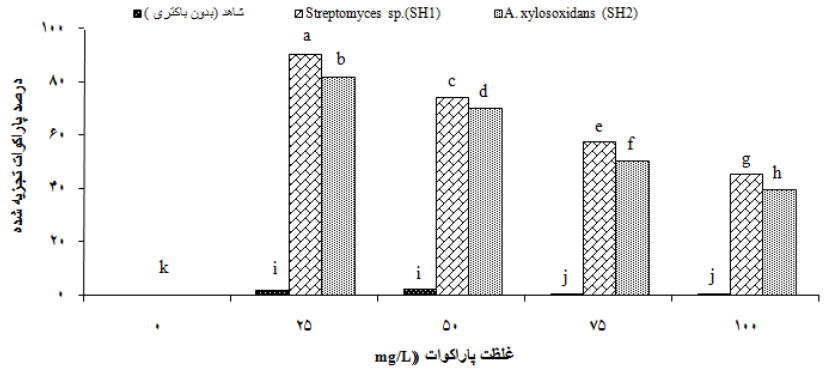
نام آغازگر	مشخصات آغازگر	دمای اتصال
8F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	Tm:40
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	



شکل 1- باندهای به‌دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR به‌ترتیب از جدایه‌های SH-1، SH-2، شاهد مثبت، *Bacillus megaterium* (P) و شاهد منفی که تمام اجزاء PCR به جزء DNA باکتریایی (N) می‌باشند



الف-در عدم حضور گلوکز (آزمون دانکن $p<0/01$)



شکل 2- درصد تجزیه پاراکوات توسط باکتری‌های *Streptomyces* sp. و *A. xylosoxidans* نسبت به شاهد (بدون باکتری)
ب- در حضور گلوکز (آزمون دانکن $p<0/01$)

جدول 2- تست‌های بیوشیمیایی و خصوصیات مورفولوژیکی *Achromobacter xylosoxidans* و *Streptomyces* sp.

جدایه‌ها پس ازتکمیل شناسایی *Achromobacter xylosoxidans* (SH-2)	(مولکولی، بیوشیمیایی و مورفولوژی) *Streptomyces* sp. (SH-1)	خصوصیات مورفولوژی و تست‌های بیوشیمیایی
میله‌ای	رشته‌ای	شکل باکتری
صاف	غیرصاف	شکل کلنی
سفید- شیری	صورتی	رنگ کلنی
-	+	واکنش گرم
متحرک	غیرمتحرک	تحرک
+	-	رشد در شرایط بی‌هوازی
+	-	تست اکسیداز
+	+	نیترات رداکتاز
-	+	تست کازئین
-	+	تست اوره‌آز
+	+	تست پروتئاز
-	+	تست آمیلاز
+	+	تست کاتالاز
-	+	تست ژلاتیناز
*	+	تست استراز
+	+	تست گلوکز
-	+	تست لاکتوز
*	+	تست مالتوز
*	-	تست مانوز
+	+	تست سیترات
+	+	رشد در کلرید سدیم 5%
+	-	رشد در کلرید سدیم 7%
+	-	رشد در کلرید سدیم 10%
+	-	رشد در 50°C
*	-	رشد در 60°C

* عدم انجام آزمایش

جدول 3- تجزیه واریانس اثر باکتری، غلظت پاراکوات و گلوکز بر درصد تجزیه پاراکوات

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
باکتری	2	15845/702**
پاراکوات	4	5740/972**
باکتری× پاراکوات	8	1260/356**
گلوکز	1	3666/459**
باکتری× گلوکز	2	1079/612**
پاراکوات× گلوکز	4	364/256**
باکتری× پاراکوات× گلوکز	8	112/668**
خطا	60	0/124
ضریب تغییرات (%)		1/26

**معنی‌دار در سطح احتمال 1%

فهرست منابع:

1. Al-Araji, M.K. and Ali, S. 2013. Bacterial Infections Caused by *Achromobacter xylosoxidans*. Medical Journal of Babylon 10(1): 1-10**.**
2. Almeida, D., Rafael Menck, D.A. and Mauricio, Y. 2010. Enzymatic-spectrophotometric determination of paraquat in urine and samples. Toxicology Mechanisms and Methods 20(7): 424-427.
3. Anderson, J.R. and Drew, E.A. 1972. Growth characteristics of a species of *Lipomyces* and its degradation of paraquat. Journal of General Microbiology 70: 43-58.
4. Arias-Estevez, M., Lopez-Periago, E., Martinez-Carballo, E., Simal-Gandara, J., Mejuto, J.C. and Garia-Rio, L. 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. Agriculture Ecosytem and Environment 123(4): 247-260.
5. Baldwin, B.C., Bray, M.F. and Geoghegan, M.J. 1966. The Microbial Decomposition of Paraquat. Biochemical Journal 101: 15.
6. Bozarth, G.A., Funderburk JR, H.H. and Curl, E.A. 1966. Studies of the degradation of 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium salt. Weed Association America Journal 55:(Abstract).
7. Burns, R.G. and Audus, L.J. 1970. Distribution and breakdown of paraquat in soil. Weed Research 10(1): 49-58.
8. Carr, R.J.G., Bilton, R.F. and Atkinson, T. 1985. Mechanism of biodegradation of paraquat by *Lipomyces starkeyi*. Applied and Environmental Microbiology 49(5): 1290-1294.
9. Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M. and Sanyal, N. 2008. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. Indian Journal Microbiology 48(1): 114-127.
10. Curtin, L.V. 1983. Molasses–general considerations, in molasses in animal nutrition. National Feed Ingredients Association. p. 1-11.
11. Cycon, M., Wojcik, M. and Seget, Z.P. 2009. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Psedomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. Chemosphere 76: 494-501.
12. Dillewijn, C.V. 1952. Botany of the Sugar Cane, Chronica Botany. Waltham, Mass. p. 450.
13. Duah-Yentumi, S. and Johnson, D.B. 1986. Changes in soil microfl ora in response to repeated applications of some pesticides. Soil Biology and Biochemicals18(6): 629–635.
14. Funderburk JR, H.H. 1969. Diquat and Paraquat. p. 283-298. In: Kearney, P.C. and Kausman, D.D. (eds.). Degradation of herbicides. Marcel Dekker, New York.
15. Gilliland, R.L. 2004. Pesticide adsorption and half-life in soil. SCS/ARS/CES, USDA, Pesticide Properties Database for Environmental Decision- Making. p. 1-2.
16. Gupta, VV.S.R., Roberts, G. and Putcha, S. 2000. Soil Health: the role of microbes in crop productivity. p. 639-643. Proceedings of 10th Australia Cotton Conference Brisbane.
17. Hance, R.J., Byast, T.H. and Smith, P.D. 1980. Apparent decomposition of paraquat in soil. Soil Biology and Biochemistry 12(4): 447-448.
18. Jones, R.W. and Garland, P.B. 1977. Sites and specificity of the reaction of bipyridylium compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. Biochemical Journal 164(1):199-211.
19. Jones, R.W., Gray, T.A. and Garland, P.B. 1976. A study of the permeability of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* to reduced and oxidised benzyl viologen and methyl viologen cations: complications in the use of viologens as redox mediators for membrane bound enzymes. Biochemical Society Transactions 4(4):671-673.

20. Kalwasinska, A., Kesy, J. and Donderski, W. 2008. Biodegradation of carbendazim by epiphytic and neustonic bacteria of eutrophic Chelmzynskie lake. Journal of Microbiology 57(3): 221-230.
21. Kelemente, Z., Ruaolph, K. and Sands, D.C. 1990. All offers for methods in phytobacteriology. Akademiai Kiaao, Budapest .
22. Knepil, J. 1977. A short, simple method for the determination of paraquat in plasma. Clinica Chimica Acta, Elsevier North Holland Biomedical Press 79(2): 387-390.
23. Koopman, D.J., Tow, P.G., Reeves, T.G. and Gibson, A.H. 1995. Soil acidification, chlorsulfuron application and *Rhizobium meliloti* as factors in lucerne yield decline. Soil Biology and Biochemistry 27(4): 673-675.
24. Kopytko, M., Chalela, G. and Zauscher, F. 2002. Biodegradation of two commercial herbicides (Gramoxone and Matancha) by the bacteria *Pseudomonas putida*. Electronic Journal of Biotechnology 5(2): 184-195.
25. Kuntom, A., Kifli, H. and Tanya, Y.A. 1999. Methods for the determination of paraquat residue in oil matrix. Journal of Oil Palm Research 2(2): 57-62.
26. Kutzner, H.J. 1986. The Family *Streptomycetaceae*. p. 2028-2083. In: Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A. and Schlegel, H.G. (eds.). The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, Springer-Verlag, New York. 2.
27. Leung, M. 2004. Bioremediation: Techniques for Cleaning up a mess. Journal of Bioremediation Teachnique Journal 2: 18-22.
28. Li, W., Dai, Y., Xue, B., LI, Y., Peng, X., Zhang, J. and Yan, Y. 2009. Biodegradation and etoxification of endosulfan in aqueous medium and soil by *Achromobacter xylosoxidans* strain CS5. Journal of Hazardous Materials 167(1-3): 209-216.
29. McGuckin, M.B., Thorpe, R.J., Koch, K.M., Alavi, A., Staum, M. and Abrutyn, E. 1982. An outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* related to diagnostic tracer procedures. American Journal of Epidemiol 115:785–93.
30. Mehrotra, A.K., Karan, K. and Chakma, A. 1996. Model for In Situ Air Stripping of contaminated Soils: Effects of Hydrocarbon Adsorption. Energy Source 18(1) : 21-36.
31. Onifade, A.K. and Abubakar, F.A. 2007. Characterization of hydrocarbon- degrading microorganisms isolation from crude oil contaminated soil and remediation of the soil by enhanced natural attenuation. Research Journal of Microbiology 2(2): 149-155.
32. Otenio, M.H. and Lopes, M.T, 2005. Benzene,Toluene and Xylene Biodegradation by *Pseudomonas Putida* CCMI 852. Brazilian Journal of Microbiology 36: 258-261.
33. Pankhurst, C. 2006. Effects of pesticides used in sugarcane cropping systems on soil organisms and biological functions associated with soil health. A report prepared for the Suger Yield Decline Joint Venture. p.1-39.
34. Pankhurst, C.E., Hawke, B.A., McDonald, H.J., Kirby, C.A., Buckerfield, J.C., Michelsen, P.U., Brien, K.A., Gupta, VV.S.R. and Doube, B.M. 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. Australia Journal Expert Agriculture 35(7): 1015–1028.
35. Peterson, D.E., Regehr, D.L., Thompson, C.R. and Al-khatib, K. 2001. Herbicide mode of action. Kansas State University, Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. p.24..
36. Rafael Menck, D.A. and Mauricio, Y. 2010. Ingentaconnect enzymatic-spectrophotometric determination of paraquat in urine and samples: A method based on its toxic mechanism. Toxicology Mechanisms and Methods 20(7): 424-427.
37. Rao, P.S.C., Bellin, C.A. and Brusseau, M.L. 1993. In sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil.Soil Science Socity of America and American Socity of Agronomy, Madison 32: 1-26

38. Ricketts, D. 1998. Paraquat is intrinsically biodegradable. 9th International Congress of Pesticide Chemistry. The Food-Environment Challenge 2: 6A-018.
39. Sambrook.J. and Russel, D.W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Third dition. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1,2,3:2001-2100.
40. Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria. p. 1-373. In: Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. (eds.). Third Edition. the American Phytopathological Society, Minnesota.
41. Seeger, M., Hernández, M., Méndez, V., Ponce, B., Córdova, M. and González, M. 2010. Bacterial degradation and bioremediation of chlorinated herbicides and biphenyks. Journal of Soil Science Plant Nutrient 10(3): 320-332.
42. Simpson, B.W., Ruddle, L.J., Packett, R. and Fraser, G. 2001. Minimising the risk of pesticide runoff–what are the options?. Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology 23: 64-69.
43. Smith, S.N. and Lyon, A.J.E. 1976. The uptake of paraquat by soil fungi. New Phytology 76: 479-484
44. Strnad, H., Ridal, J., Paces, J., Kolar, M., Vlcek, C. and Paces, V. 2011. Complete Genome Sequence of the Haloaromatic Acid-Degrading Bacterium *Achromobacter xylosoxidans* A8, Journal of Bacteriology 193(3): 791-792.
45. Summers, L.A. 1980. The bipyridinium herbicides. Academic Press, London, Department of Medical Science 61: 316-916.
46. Suthar, S. 2009. Bioremediation of Agricultural Wastes through Vermicomposting. Bioremediation Journal 13(1): 21-28.
47. Tresner, H.D., Hayes, J.A. and Backus, E.J. 1968. Differential tolerance of streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic acid. Apply Microbiology 16: 1134-1136.
48. Vedler, E., Koiv, V. and Heinaru, A. 2000. Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. Denitrificans strain EST4002 255(2): 281–288.
49. Wenzel, W. 2008. Rhizospher processes and management in plant- assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. Plant and Soil 321(1): 385-408.
50. Won, S-H., Lee, B-H., Lee, H.S. and Jo, J. 2001. An *Ochrobactrum anthropi* gene1 conferring paraquat resistance to the heterologous host *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications 285(4): 885-890.
51. Yang, C.H., Shih, N.C. and Lu, D.C.T., 2007. Infect*ive endocarditis due t*o *Achromobacter xylosoxidans* associated with spondylodiscitis *a case report. Se*ction of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine,Lo-Tong Poh-Ai Hospital, Ilan, Taiwan18: 212-216.
52. Yueh, L.Y. and Hansley, D.L. 1993. Pesticide effect on acetylene reduction and nodulation by soybean and limabean. Journal of the American Societr for Horticultural Science 118(1): 73-76.
53. Zhang, C., Zeng, G, Yuan, Yu., Li, J., Huang, G., Xi, B. and Liu, H.2007. Aerobic degradation of bisphenol A by *Achromobacter xylosoxidans* strain B-16 isolated from compost leachate of municipal solid waste. Chemosphere 68(1): 181–190.
36. Zongqiang, G.K., Berndt- Michael, A. and Peijumli, W. 2007. Activated carbon adsorption of PAHs from vegetable oil used in soil remediation. Journal of Hazardous Material 143(2): 372-378.