جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده علف‌کش متریبوزین در خاک‌های آلوده تحت کشت استان زنجان

Isolation and Identification of Metribuzin Herbicide-Degrading Bacteria from Contaminated Cultivated Soils of Zanjan Province

زهره طاهری[۱]، فروزان قاسمیان رودسری[۲*] و معصومه افشاری[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۴

چکیده

علف‌کش متریبوزین از جمله تریازین‌هایی است که به‌مدت طولانی در خاک باقی‌مانده و با انتقال به منابع آب و خاک موجب آلوده شدن و افزایش سمیت زیستی می‌شود. تجزیه میکروبی نقش اساسی در حذف علف‌کش‌های گروه تریازین دارند. پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی توانمند در جذب علف‌کش متریبوزین در منابع خاک استان زنجان انجام شد. برای این منظور، نمونه‌برداری از خاک مزارع ذرت، سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری در فصل بهار انجام شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌های خاک و کشت آن‌ها در محیط‌کشت، باکتری‌های رشد یافته خالص‌سازی شدند. بررسی سینتتیک رشد باکتری‌ها نشان داد که جدایه‌های ZT12، ZT15 و ZT19 از بین ۲۱ جدایه باکتری جداسازی شده، با افزایش مقدار علف‌کش تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیش‌ترین رشد را داشته و ZT15 شاخص‌ترین جدایه با جذب نوری ۰/۸۶۲۹ شناسایی شد. غلظت‌های بیش‌تر از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش رشد جدایه ZT15 شد. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی ژن *16S rRNA* نشان داد که باکتری‌های ZT12، ZT15 و ZT19 به‌ترتیب سویه‌هایی از باکتری‌های جنس *Enterobacter cancerogenus*، *Klebsiella* sp. و *Staphylococcus* sp. هستند. نتایج بررسی‌های انجام شده در خصوص حضور یا عدم‌حضور ژن *TrzA* برروی پلاسمید و ژنوم باکتری در هر سه جدایه نشان داد که این ژن بر روی پلاسمید باکتری‌ها قرار دارد. با توجه به توانایی باکتری‌های مقاوم شناسایی شده در این تحقیق، تلقیح جدایه‌های بومی تجزیه‌کننده علف‌کش و همچنین استفاده از خالص‌سازی و استخراج آنزیم‌های تجزیه‌کننده آن جهت پالایش آلاینده‌ها در محیط‌های آلوده می‌تواند، مناسب باشد.

واژه‌های کلیدی: پالایش زیستی، پلاسمید، تریازین، ژن *16S rRNA*، زنجان

۱، ۳ و ۲. به‌ترتیب دانشجویان کارشناسی‌ارشد و استادیار، گروه زیست‌شناسی و علوم محیط زیست، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان

*: نویسنده مسوول Email: f-ghasemian@znu.ac.ir

مقدمه

رشد روزافزون جمعیت و نیاز آن‌ها به غذا و عدم امکان افزایش زمین‌های زراعی بیشتر منجر به استفاده از عوامل شیمیایی آفت‌کش و کودهای شیمیایی در تولید محصول‌های زراعی شده است تا عملکرد را در واحد سطح افزایش دهند. در این ارتباط استفاده از علف‌کش‌ها یکی از مهم‌ترین نهاده‌هایی است که با هدف حفاظت از محصولات زراعی به‌کار می‌روند. علف‌کش‌ها یکی از نهاده‌های مهم و ضروری در نظام‌های زراعی کشورهای پیشرفته محسوب شده و بخش قابل‌توجهی از عملکرد محصولات زراعی این کشورها متأثر از مصرف انواع علف‌کش است *موسوی* و همکاران (Mosavi *et al.*, 2005). براساس اطلاعات و آمار سهم مصرف سموم علف‌کش، حشره‌کش، قارچ‌کش و کنه‌کش از کل سموم مصرفی در کشور به‌ترتیب ۴۴، ۳۷، ۱۷ و دو درصد است *زند* و همکاران (Zand *et al.*, 2007). علف‌کش‌ها ازجمله ترکیباتی هستند که سوء مصرف آن‌ها در این زمینه قابل توجه است. کشور ما ازجمله کشورهایی است که علف‌کش‌ها به‌صورت بی‌رویه مورد استفاده قرار می‌گیرند، به‌طوری‌که میزان مصرف سموم علف‌کش در کشور ما سالانه به‌طور میانگین ۱۲ میلیون کیلوگرم ذکر شده است. به‌طور متوسط در زراعت دنیا برای هر هکتار ۰/۸ کیلوگرم سم مصرف می‌شود ولی در ایران حدود هفت کیلوگرم است (*حاجی شرفی و شکوهفر* HaghyShara phy and Shokuhfar, 2009). بخش اعظم آفت‌کش‌های مصرفی به هدف نرسیده و با ورود به محیط زیست موجب آلودگی منابع آب، خاک و هوا شده و باعث بروز انواع مسمومیت‌ها می‌شوند و به موجودات غیرهدف شامل کارگران مزارع، پرندگان، زنبورهای عسل و ماهی‌ها نیز که هم‌پای موجودات هدف در معرض سموم قرار می‌گیرند آسیب رسانده و در نتیجه تبعات زیست‌محیطی وسیعی را به‌دنبال خواهند داشت *موسوی* (2001). با وجودی که علف‌کش‌ها فقط یکی از عوامل موجود برای کنترل علف‌های هرز در مزارع هستند، ولی اکثر کشاورزان، مدیران مزارع و برخی کارشناسان به‌دلیل درجه تأثیرگذاری علف‌کش‌ها، انتظار دارند همه مشکلات مربوط به وجود علف‌های هرز را تنها با استفاده از علف‌کش‌ها برطرف نمایند که چنین امری منجر به بالا رفتن هزینه کنترل می‌شود (موسوی و ژانگ و همکاران Mousavi, 2001, Zhang et al., 2014). اگرچه علف‌کش‌ها نسبت به سایر آفت‌کش‌ها برای انسان کم‌خطرتر هستند، ولی به مرور در بدن تجمع یافته و زمانی که غلظت آن‌ها به حد معینی برسد، کشنده می‌شوند (*وهاب‌زاده* و همکاران Vahabzade *et al.*, 2003).

تریازین مشتقات هتروسیکلیک نیتروژن و کربن هستند و ساختمان اصلی شیمیایی آن‌ها دارای سه اتم کربن و نیتروژن است (*زند* و همکاران Zand *et al.*, 2008). متریبوزین از مهم‌ترین گروه تریازینون‌ها و از بازدارندگان فتوسیستم II است که به‌طور گسترده‌ای در کنترل علف‌های هرز محصولات زراعی از قبیل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و گندم به‌کار می‌روند. این علف‌کش جزء علف‌کش‌های با ماندگاری متوسط و بالا (در حدود نه ماه) در خاک محسوب شده و آبشویی تدریجی و رواناب آن‌ها تهدیدی جدی برای آلودگی آب‌های زیرزمینی و جاری است (*آرسنالت و ایوانی*؛ *ماندی و مانشی*؛ *شارون و استفنسون*؛ *ایزاک و زیمدال* Arsenault and Ivany, 2001; Mondy and Munshi, 1990; Sharom and Stephenson, 1976; Hyzak and Zimdahl, 1974). براساس اطلاعات آژانس حفاظت محیط‌زیست ایالات متحده غلظت مجاز سم متریبوزین در خاک‌های کشاورزی ۲۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شده است (*دوسانتس* و همکاران Dossantes *et al.*, 2004). باقی‌مانده سموم مختلف توسط عوامل شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی از محیط خاک حذف می‌شوند. یکی از روش‌های تجزیه باقی‌مانده سموم در محیط خاک، شناسایی و به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده به‌عنوان تجزیه‌گر زیستی است (*ژانگ* و همکاران Zhang *et al.*, 2014). در این میان شناسایی و جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده بومی منطقه با در نظر گرفتن بهینه شدن همزمان میکروارگانیسم مورد نظر به تجزیه سم هدف و رشد در شرایط محیطی مناطق آلوده امری مهم است (*ابوعامر*؛ *چن* و همکاران Abo-Amer, 2011; Chen *et al.*, 2011). نتایج تحقیقات مختلف نشان داده که انواع مختلفی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها قادر به تجزیه و از بین بردن تریازین‌ها هستند؛ *زابلوتوویچ* و همکاران؛ *گو* و همکاران (Zablotowicz *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2003).

در کشور ما با توجه به استفاده گسترده از علف‌کش‌های خانواده تریازین‌ها نیاز به روش‌های پاک‌سازی کارآمد، اقتصادی و سازگار با محیط‌زیست برای رفع آلودگی از محیط‌های آلوده امری ضروری است. این درحالی است که به‌رغم تجربه جهانی در این زمینه، تجربه اجرای پروژه میدانی پاک‌سازی زیستی خاک در کشور ما تاکنون وجود نداشته و یا به‌صورت اندک به اجرا درآمده است. یکی از عوامل مهم این کمبود، ناشناخته بودن میکروارگانیسم‌های بومی موثر در تجزیه علف‌کش‌های تریازین است.

بنابراین هدف از اجرای این پژوهش جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده علف‌کش متریبوزین در خاک‌های آلوده، شناسایی توالی *16S rRNA* باکتری‌های جداسازی شده به‌عنوان بهترین روش تشخیصی و شناسایی باکتری‌ها و بررسی احتمال حضور ژن *TrzA* بر روی پلاسمید یا کروموزوم جدایه‌های شناسایی

شده جهت افزایش بیان ژن موثر در تجزیه بیشتر سموم از مناطق آلوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع آلوده

نمونه‌برداری از مزارع ذرت، سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی در فصل بهار زمانی که حداکثر استفاده از این سم وجود داشت در استان زنجان انجام شد. برای این منظور از لایه سطحی عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری از ۱۵ نقطه مختلف (در مجموع ۴۵ نقطه) در مزارع منتخب نمونه‌های خاک جمع‌آوری و پس از مخلوط کردن نمونه‌های خاک در هر مزرعه یک نمونه شاهد تهیه و از الک دو میلی‌متری عبور داده شدند. نمونه‌های خاک الک شده در شرایط استریل و دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. مواد و محیط‌های کشت استفاده شده متریبوزین با خلوص ۹۹/۹۹ درصد برای اضافه شدن به محیط‌کشت از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد. محیط‌کشت نوترینت براث (Nutrient Broth, NB) برای یکسان‌سازی *آلتوم* و *استریتزک* (Altom and Stritzke 1973)، محیط‌کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar, NA) جهت مانیتورینگ *اودوانی* و همکاران (Udeani *et al.*, 2009)، محیط‌کشت پایه نمکی (Basal Salt Medium, BSM) مایع و جامد (بر لیتر) شامل نمک‌های یک گرم KNO_3، دو گرم KH_2PO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۱ گرم NaCl و ۰/۰۲ گرم $CaCl_2$ و عناصر میکرو (بر لیتر) شامل پنج گرم $ZnSO_4$، یک گرم $MnSO_4.H_2O$، ۰/۴ گرم $CuSO_4.5H_2O$، ۰/۲۵ گرم $NaMoO_4$، ۰/۲ گرم $Na_2B_4O_7.10H_2O$ و یک گرم $FeSO_4.7H_2O$ برای کشت و فرآیند غنی‌سازی استفاده شد *وانگ* و *ژی* (Wang and Xie 2012).

جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سم

نمونه خاک‌های شاهد با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد به حجم رسانده شده و به هر بشر ۰/۸ گرم متریبوزین اضافه، مخلوط و ۱۴۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۱۱۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سه روز اول هر ۲۴ ساعت یک‌بار ۰/۸ گرم و در سه روز پایانی یک گرم سم متریبوزین خالص به هر ظرف اضافه شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر نمونه‌های حاوی سلول‌های باکتریایی از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} به محیط‌کشت پایه نمکی جامد غنی شده با سه گرم بر لیتر متریبوزین، جهت جداسازی باکتری‌های توانمند در تجزیه سم، منتقل شده و به این ترتیب سویه‌های باکتریایی، با کشت گسترده در محیط‌کشت پایه نمکی غنی شده با متریبوزین جداسازی و براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی جدا شده و با استفاده از محیط‌کشت پایه نمکی جامد غنی شده با متریبوزین در شش تکرار خالص‌سازی شدند *اودوانی* و همکاران (Udeani *et al.*, 2009). طیف‌سنجی کلنی باکتری‌های جداسازی شده در چهار غلظت ۲۵، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متریبوزین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام شد (*وانگ و ژی*، 2012). طیف‌سنجی تا پنج روز ادامه داشت و باکتری‌های توانمند در تجزیه متریبوزین از این جدایه‌ها جهت انجام ادامه مراحل استفاده گردید.

آزمایش‌های بیوشیمیایی

آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم (Gram staining)، آزمایش کاتالاز (Catalase activities)، آزمایش اکسیداز (Oxidase activities) و هیدرولیز اوره (Urease) مطابق مرجع برگی *کریگ* و *هولت* (Krieg and Holt 1984) انجام شد.

شناسایی مولکولی باکتری‌های تجزیه‌کننده سم:

استخراج دی‌ان‌ای ژنومی با استفاده از روش *کوربین* و همکاران (Corbin *et al.*, 1994) انجام شد. برای این منظور، ژن *16S rRNA* باکتریایی با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) و 1492R (TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T) تکثیر و برای توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، نمونه‌ها به همراه آغازگرهای داخلی طراحی شده به‌صورت دوبار خوانش توالی‌یابی و نتیجه توالی‌یابی به‌صورت کروماتوگراف تهیه شد. نتیجه توالی‌یابی پس از بررسی و مطابقت با کروماتوگراف‌های ارسال شده از لحاظ صحت نوکلئوتیدهای توالی‌یابی شده، با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی Blast، Editseq، Chromas و Mega4 بررسی و توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی شناسایی شدند. مقایسه تشابه *16S rRNA* و ارتباط درخت تبارزایی (Phylogenic) مطابق روش *ویز* (Woese, 1987) انجام شد.

بررسی وجود ژن تجزیه‌کننده علف‌کش متریبوزین

برای شناسایی محل قرارگیری ژن تجزیه‌کننده سم (*TrzA*) مراحل انجام استخراج پلاسمید با روش *سمبروک* و همکاران (Sambrook *et al.*, 1989) و برای انتقال پلاسمید به باکتری اشرشیا کولی از روش انجماد و ذوب *سمبروک و راسل* (Sambrook and Russell, 2001) استفاده شد.

یافته‌ها

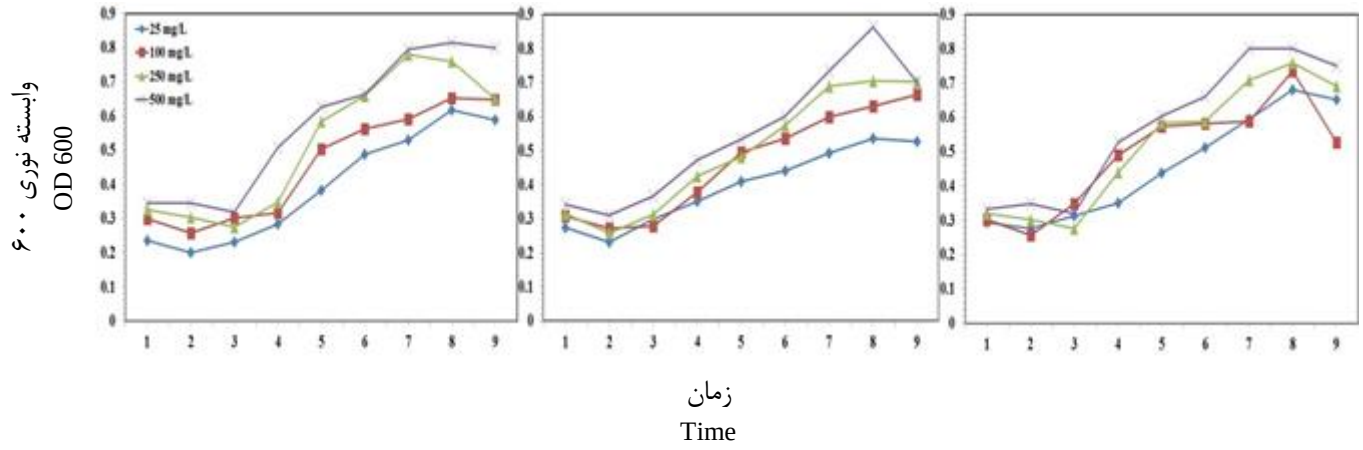
ویژگی خاک‌های مورد مطالعه: بافت خاک غالب در نمونه‌های خاک در کلاس بافت نسبتاً سنگین لوم رسی قرار دارد. ظرفیت تبادل کاتیونی خاک های مورد مطالعه بین ۱۷/۵ تا ۲۱/۲ سانتی‌مول بر کیلوگرم، اسیدیته متوسط نمونه‌ها از ۷/۵ تا ۷/۸ متغیر است. مقدار متوسط ماده آلی در خاک‌ها کمتر از دو درصد و مقدار نیتروژن در نمونه‌های خاک کمتر از ۰/۵ درصد است. مقدار اولیه متریبوزین در نمونه‌های خاک در منطقه مورد مطالعه مشخص نیست، اما به‌دلیل استفاده طولانی مدت از این علف‌کش در این مزارع احتمالاً حضور و تجمع این سم وجود دارد.

جدا سازی و شنا سایی باکتری‌های تجزیه‌کننده متریبوزین: برای جدا سازی و شنا سایی باکتری‌های تجزیه‌کننده علف‌کش متریبوزین کلنی‌های متفاوت از لحاظ ظاهری جداسازی و ۲۱ نوع باکتری متفاوت به‌دست آمد. سه جدایه ZT12، ZT15 و ZT19 که از لحاظ میزان رشد بهترین سویه‌های باکتریایی در محیط‌کشت پایه نمکی فاقد هر گونه منبع کربن بوده و رشد باکتری‌ها در آن به منزله توانایی شکستن متریبوزین و استفاده از سم به‌عنوان منبع انرژی است شناسایی و بررسی‌های تکمیلی بعدی بر روی آن‌ها انجام شد. میزان رشد بهترین جدایه‌های شنا سایی شده با توجه به غلظت‌های متفاوت سم در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، رشد جدایه‌ها در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متریبوزین نسبت به سایر غلظت‌های سم استفاده شده بهتر انجام می شود. بالاترین دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متریبوزین، برای جدایه ZT12 ۰/۸۱۵۱، برای جدایه ZT15 ۰/۸۶۲۹ و برای جدایه ZT19 ۰/۸۰۱۷ است و بیش‌ترین دانسیته مربوط به جدایه ZT15 بود، هم‌چنین با افزایش غلظت متریبوزین به ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در تمام جدایه‌های مطالعه شده، رشد باکتری‌ها کاهش یافت. نتایج به‌دست آمده از جذب نوری با بیشینه رشد در ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های بومی شنا سایی شده دارای توان جذب متریبوزین هستند. نتایج آزمایش های بیوشیمیایی برای شناسایی هویت جدایه‌های باکتریایی ZT12، ZT15 و ZT19 تجزیه‌کننده علف‌کش متریبوزین در جدول ۱ و شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ناحیه 1500 bp در شکل ۳ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جدایه‌های توانمند

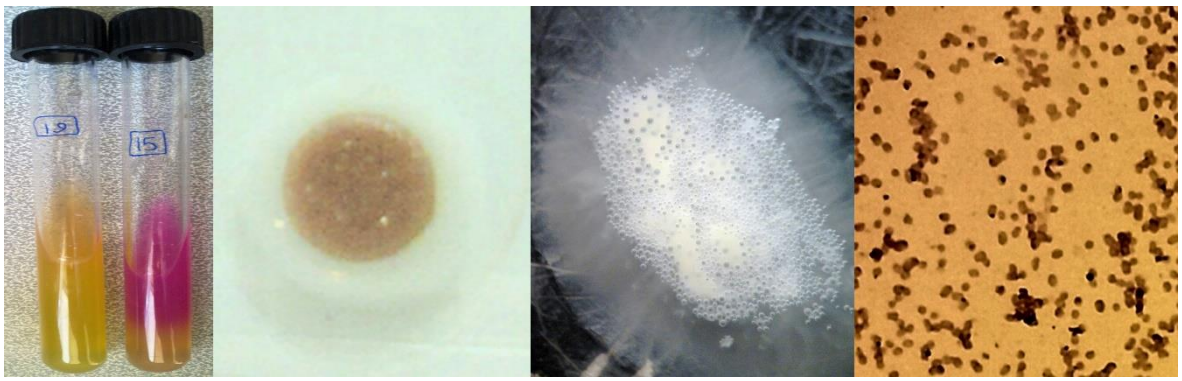
Table 1: The results of biochemical capable isolation

نام جدایه Isolated named	آزمایش گرم Gram staining	شکل باکتری Bacterial shape	رنگ کلنی Colony color	اکسیداز Oxidase	کاتالاز Catalase	اوره‌آز Urease
ZT12	+	کوکوسی Coccus	زرد Yellow	-	+	+
ZT15	+	کوکوسی Coccus	کرم Cream	-	+	+
ZT19	+	کوکوباسیل Coccobacill	سفید White	-	+	-



شکل ۱: میزان رشد جدایه‌های ZT12، ZT15 و ZT19 در غلظت‌های متفاوت متریبوزین

Fig. 1: Isolated growth rate of ZT12, ZT15 and ZT19 in different concentrations of metribuzin

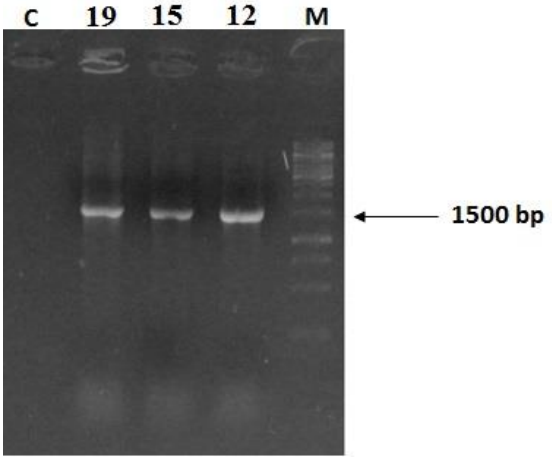


شکل ۲: شکل کلنی، نتایج آزمون کاتالاز، اکسیداز و آوره‌آز جدایه ZT15

Fig. 2: The morphology, colony color and oxidase, catalase and urease test results of isolated ZT15

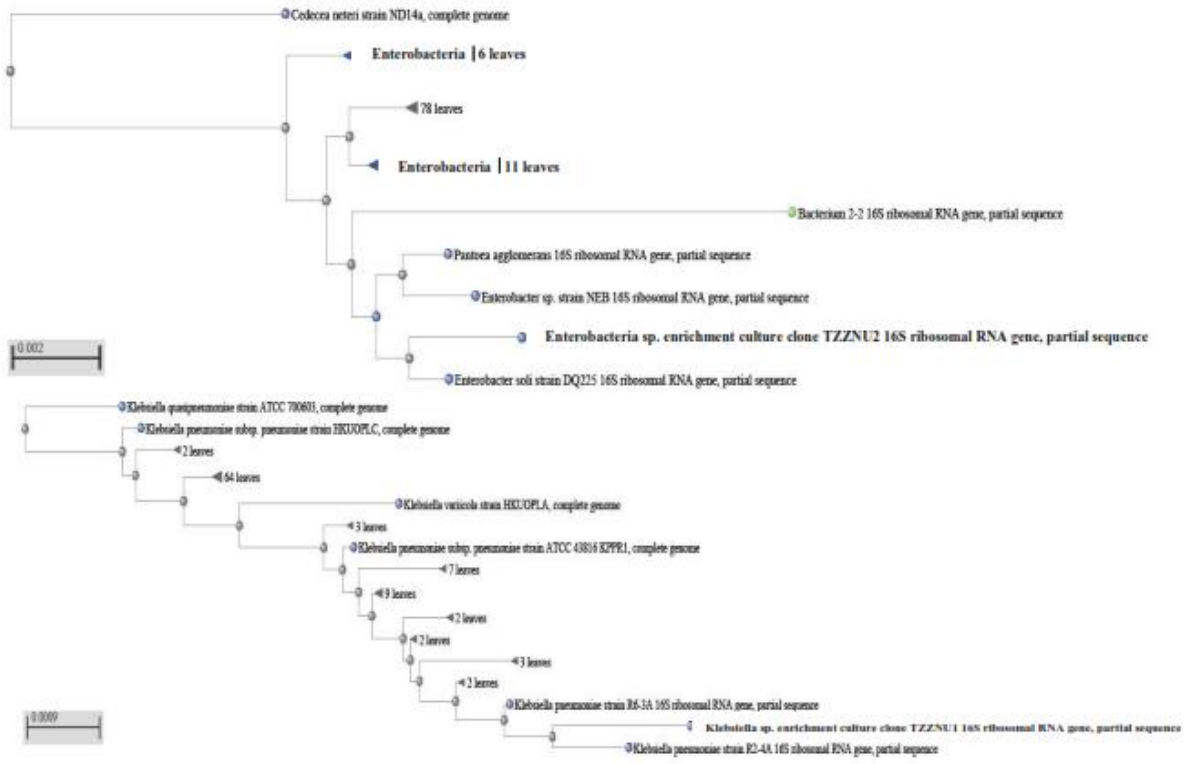
توالی جدایه‌های ZT12، ZT15 و ZT19 مورد بررسی و مطالعه درخت تبارزایی انجام و در بانک جهانی ژن ثبت و توالی این جدایه‌ها تفسیر شدند. جدایه ژنوم باکتری ZT12 با باکتری *Enterobacter cancerogenus strain KNUC5011* دارای ۹۹ درصد شباهت و تفاوت پنج نوکلئوتیدی، توالی‌های قطعات نوکلئوتیدی تکثیر شده در جدایه ZT15 با باکتری *Klebsiella* sp. *J2-K* دارای ۹۹ درصد شباهت و تفاوت هشت نوکلئوتیدی و توالی‌های قطعات نوکلئوتیدی تکثیر شده در جدایه ZT19 با باکتری *Staphylococcus* sp. *PSB-21* دارای ۹۹ در صد شباهت و تفاوت نه نوکلئوتیدی بارز بین دو توالی است. تشخیص سویه‌های بومی مقاوم و تجزیه‌کننده علف‌کش متریبوزین اولین گام در به‌کارگیری آن‌ها در مطالعه، استخراج و تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده علف‌کش در پاک‌سازی زیستی است که از پتانسیل‌های بالقوه موجود در این باکتری‌ها بوده و قابل بهره‌برداری است. سویه‌های به‌دست آمده در این تحقیق با شماره‌های دستیابی KT804629، KT804627 و KT804630 در پایگاه اطلاعاتی GenBank ثبت شدند. شکل ۴ نشان‌دهنده درخت تبارزایی خلاصه شده جدایه‌های ZT12، ZT15 و باکتری‌های مرجع در پایگاه اطلاعاتی GenBank را نشان می‌دهد (درخت تبارزایی برای جدایه ZT19 به‌دلیل شاخه‌های فراوان موجود در توالی و عدم حذف آن‌ها نشان داده نشده است).

برای شناسایی محل قرارگیری ژن *TrzA* بر روی پلاسمید و یا ژنوم باکتری، پلاسمید جدایه‌های ZT12، ZT15 و ZT19 استخراج گردید. نتایج استخراج پلاسمید سویه ZT15، و صحت آن با استفاده از ژل آگارز یک در صد، الکتروفورز و دستگاه UV مشابه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ظهور باند بررسی شد (نتایج نشان داده نشد). پس از حصول اطمینان از نتیجه استخراج صحیح پلاسمید بر روی ژل و انتقال ماده ژنتیکی به باکتری اشرشیا کولی که در این حالت به آن باکتری ترنسفورم‌شده اطلاق می‌گردد و سپس با کشت بر روی محیط پایه نمکی جامد غنی‌شده با متریبوزین و نوترینت آگار و مشاهده رشد باکتری‌های ترنسفورم‌شده بر روی محیط‌کشت گزینش‌گر هم‌چنین عدم رشد باکتری‌های ترنسفورم نشده بر روی این محیط‌کشت، نتیجه گرفته شد که ژن تجزیه‌کننده متریبوزین در هر سه جدایه بر روی پلاسمید باکتری قرار گرفته است. بررسی رشد باکتری‌های ترنسفورم شده و ترنسفورم‌نشده در محیط‌کشت نوترینت آگار مورد راست‌آزمایی قرار گرفت و نتیجه گرفته شد که مراحل انتقال ماده ژنتیکی صحیح است. نتایج تعیین محل قرارگیری ژن بر روی پلاسمید می‌تواند در افزایش بیان ژن جدایه‌های شناسایی شده جهت تجزیه سم و استفاده از آن‌ها به‌منظور پاک‌سازی مناطق آلوده موثر باشد.



شکل ۳: نمایش محصول PCR (قطعه 1500 bp) حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA* جدایه‌های جدا شده به همراه مارکر مولکولی وزنی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با سایز1kb

Fig. 3: View product PCR (piece 1500bp) of the *16S rRNA* gene amplification isolated on agarose gel 1.5 percent along with molecular markers weight with 1 kb size



شکل ۴: درخت تبارزایی برای جدایه‌های ZT12 و ZT15

Fig. 4: Phylogenetic tree of isolated ZT12 and ZT15

بحث

جداسازی و شناسایی گونه‌های باکتریایی توانمند تجزیه‌کننده متریبوزین در این تحقیق همانند مطالعه *تامیلسلوان* و همکاران؛ *ژانگ* و همکاران؛ *گوپال* و همکاران (Tamilselvan *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Gopal *et al.*, 2011) و سایر پژوهش‌های انجام شده در این زمینه از خاک‌های آلوده انجام شده است زیرا خاک اولین بخش تحت تأثیر و مخزن اصلی نگهداری این سم است، محققان دیگری همچون *الوابل* و همکاران و *لیو* و همکاران (Al-Wabel *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015) بر روی پساب‌های آلوده به علف‌کش متریبوزین پژوهش کرده‌اند.

تامیلسلوان و همکاران (2014) در تحقیقات خود با عنوان تجزیه زیستی متریبوزین و پروفنوفوس توسط باکتری‌های مؤثر جداشده از نمونه‌های خاک جدایه‌های باکتری‌های مؤثر در تجزیه آفت‌کش متریبوزین و پروفنوفوس را *Pseudomonas*

aeruginosa، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* شناسایی و گزارش کردند.

گوپال و همکاران (2011) در پژوهشی تحت عنوان تجزیه زیستی متریبوزین و ایمیداکلوپرید در خاک‌های مزارع آلوده به این سموم گزارش کردند که باکتری هوازی توانمند در تجزیه متریبوزین و ایمیداکلوپرید باکتری *Burkholderia cepacia* است. نتایج توالی ژن *16S rRNA* باکتری جدا شده، ۹۹ درصد با باکتری فوق مطابقت داشت. نتایج آزمایش‌های ارزیابی توانایی این باکتری در تجزیه متریبوزین و ایمیداکلوپرید نشان داد که راندمان کشت باکتری در محیط پایه نمکی غنی شده با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بعد از ۲۰ روز برای سم ایمیداکلوپرید ۶۹ درصد و برای سم متریبوزین ۸۶ درصد است. نتایج داده‌ها نشان داد که باکتری *Burkholderia cepacia strain CH9* توانایی تجزیه این آفت‌کش‌ها را در محیط دارد. در این مطالعه جهت شناسایی‌های تکمیلی آزمایش‌های بیوشیمیایی گرم، کاتالاز، اکسیداز و اوره‌آز جدایه‌های مورد مطالعه نیز انجام شد درصورتی‌که در تحقیقات مشابه افرادی از قبیل *تامیلسلوان* و همکاران (2014) و *ژانگ* و همکاران (2014) اشاره‌ای به این آزمون‌ها نشده است.

لیو و همکاران (2015) در تحقیقی تحت عنوان شناسایی عوامل باکتریایی تجزیه متریبوزین در حوضچه لجن فاضلاب یک کارخانه تولیدکننده انواع آفت‌کش یک سویه بسیار کارآمد از باسیلوس را جداسازی کردند که از متریبوزین به‌عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده می‌کرد. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نشان داد که باکتری به رنگ سفید براق، دارای کلنی بزرگ و حدود صاف بوده که قطر سلول بین پنج تا هفت میلی‌متر اندازه‌گیری شد. نتایج میزان تجزیه سم با استفاده از آزمایش کروماتوگرافی گازی نشان داد که دمای مناسب برای کشت باکتری ۳۰ درجه سلسیوس و میزان تجزیه متریبوزین ۷۹ درصد بود. نتایج آزمایش‌های پایداری نشان داد که باکتری قادر به حفظ ثبات خود به‌مدت ۵۰ روز در درجه حرارت ۲۵ درجه سلسیوس است.

ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2016) در تحقیقی تحت عنوان تجزیه زیستی دلتامترین در محیط‌کشت و خاک‌های مزارع آلوده به این سم گزارش کردند که باکتری توانمند در تجزیه این سم *Bacillus cereus* است. میزان تجزیه در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر دلتامترین در دمای ۳۰ درجه سلسیوس طی ۹۶ ساعت به‌ترتیب ۹۹/۴ و ۲۲/۸ درصد بود. میزان تجزیه در نمونه‌های خاک آلوده با غلظت ۱۰ دلتامترین در ۲۵ روز ۷۴/۹ درصد گزارش شد، این درحالی بود که در نمونه فاقد باکتری میزان تجزیه سم ۴۵/۱ در صد اندازه‌گیری شد. نتایج ایشان نشان داد که باکتری *Bacillus cereus strain Y1* توانایی تجزیه و زیست‌پالایی باقی‌مانده این سم را دارد.

باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در آب‌های زیرزمینی در مناطقی که آب آن برای مصارف شرب و آبیاری استفاده می‌شود، نگرانی‌های زیست‌محیطی و بهداشتی فراوانی را ایجاد کرده است. بر همین اساس *الوابل* و همکاران (2016) در مطالعه‌ای تحت عنوان توزیع مکانی باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در آب‌های زیرزمینی مناطق کشاورزی، باقی‌مانده هفت آفت‌کش ازجمله متریبوزین را در ناحیه القاسم عربستان سعودی با استفاده از کروماتوگرافی گازی همراه با آزمایش‌های طیف‌سنجی جرمی بررسی کردند. ایشان گزارش کردند که در نمونه‌های آب تحت بررسی دیازینون به‌دنبال آن کلروپیریفوس، کربوفوران و متریبوزین مشاهده شده است. نتایج ایشان نشان داد که میزان این آفت‌کش‌ها از سطح قابل قبول آلودگی بالاتر است و بیش‌ترین غلظت آلودگی در مناطق کشاورزی گزارش شده است.

نتایج این پژوهش نشان داد که جدایه‌های به‌دست آمده سویه‌های جدیدی از جنس باکتری‌های *Enterobacter cancerogenus strain KNUC5011*، *Klebsiella* sp. *J2-K* و *Staphylococcus* sp. *PSB-21* هستند که هر سه جدایه برای اولین بار گزارش شده است. استخراج پلاسمید جدایه ZT15 و ترنسفورم آن به باکتری اشرشیا کولی نشان داد ژن تجزیه‌کننده متریبوزین روی پلاسمید این جدایه قرار دارد. *وانگ و ژی* (2012) نیز پلاسمید *Arthrobacter sp. Strain DAT1* را استخراج و مشاهده کردند ژن‌های تجزیه‌کننده *trzN*، *atzB* و *atzC* بر روی پلاسمید این جدایه قرار دارد. توالی‌یابی در این تحقیق با استفاده از آغازگر عمومی و آغازگر داخلی انجام گرفت، درصورتی‌که در اکثر تحقیقات جهت شناسایی باکتری‌ها از آغازگر عمومی استفاده شده است استفاده از آغازگرهای عمومی در موارد حساس که نیاز به نتیجه دقیق توالی‌یابی است می‌تواند منجر به ایجاد خطا شود.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق نشان داد که تجزیه زیستی باکتریایی روشی مؤثر در از بین بردن علف‌کش متریبوزین در خاک‌های آلوده به این علف‌کش است. جداسازی و رشد باکتری‌های موجود در خاک‌های آلوده به این علف‌کش قادر به تجزیه متریبوزین هستند و از متریبوزین به‌عنوان یک منبع غذایی استفاده می‌کنند. جداسازی

و خالص‌سازی سویه‌های مورد نظر به‌عنوان سویه‌های توانمند در تجزیه متریبوزین برای پاکسازی زیستی بخشی از خاک‌های آلوده استان زنجان می‌تواند، در کاهش آلودگی مزارع کشاورزی در استان زنجان مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۳-۴ متن انگلیسی مراجعه شود.

سپاس‌گزاری

از دانشگاه زنجان به خاطر حمایت‌های مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.