



مقاله کوتاه پژوهشی

تجزیه زیستی آترازین در غلظت های گوناگون به وسیله باکتری های سودوموناس

دانیال رضایی^{۱*} - غلامحسین حق نیا^۲ - امیر لکزیان^۳ - محمد حسن زاده خیاط^۴ - حوریه نصیرلی^۵

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۲۲

چکیده

استفاده گسترده از آترازین و به دنبال آن سمیت این علف کش در محیط زیست، توجه پژوهشگران را در زمینه پیدا کردن روش های نوین پالایش این آلاینده آلی به خود معطوف کرده است. یکی از روش های موثر در حذف آترازین از محیط زیست، روش تجزیه زیستی می باشد. با توجه به اهمیت آترازین به عنوان یک آلاینده آلی زیست محیطی، مطالعه ای بصورت طرح کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل در زمینه تجزیه زیستی این علف کش با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو گونه باکتری سودوموناس آرژینوزا و سودوموناس فلورسنس و سه غلظت آترازین (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) بودند. نتایج آزمایش نشان دادند که باکتری های جنس سودوموناس به طور معنی داری منجر به تجزیه آترازین شدند. باکتری سودوموناس فلورسنس آترازین را ۴۵ درصد و باکتری سودوموناس آرژینوزا ۳۸/۸۸ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت تجزیه کردند. باکتری فلورسنس به گونه ای معنی دار توان تجزیه بیشتری نسبت به باکتری آرژینوزا داشت. همچنین نتایج آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت، تجزیه آترازین به وسیله هر دو باکتری افزایش یافت به گونه ای که بیشترین درصد تجزیه به وسیله هر دو باکتری سودوموناس در غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر روی داد.

واژه های کلیدی: آلودگی، علف کش آترازین و باکتری های سودوموناس فلورسنس و آرژینوزا

مقدمه

مقارن می باشد. بدلیل تحرک زیاد و نیمه عمر نسبتا طولانی آترازین در خاک، متابولیت های این علف کش در آبهای سطحی و زیرزمینی دیده می شود (۹). تجزیه زیستی به عنوان مهمترین فرآیندی است که ضایعات آلی بطور زیستی در شرایط کنترل شده به کمک موجودات زنده تجزیه می شوند (۸). تجزیه و معدنی شدن آترازین به وسیله باکتری های گوناگونی گزارش شده است و ریزجانداران زیادی از جمله باکتری ها مانند جنس های سودوموناس، اکتینوباکتر، اگروباکتریوم، آرتروباکتر، راستونیا و نورکادیا در معدنی کردن آترازین مورد مطالعه قرار گرفته اند (۹). هدف از این پژوهش، بررسی تجزیه زیستی غلظت های گوناگون آترازین به وسیله باکتری های سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا بود.

آفت کش ها گروه ویژه ای از ترکیب های شیمیایی هستند که در حفظ سلامت عمومی و تولیدات کشاورزی نقش مهمی ایفا می کنند. استفاده گسترده از این مواد منجر به ورود مقادیر زیادی از آنها به منابع آب و خاک شده و به عنوان تهدیدی برای محیط زیست به شمار می روند. یکی از دلایل عمده آلودگی آبهای زیرزمینی، عدم کنترل کافی و رهاسازی سموم در محل های مصرف آنهاست و پالایش خاک و آبهای زیرزمینی آلوده شده در این مناطق یکی از مهم ترین مشکلات محیطی به شمار می رود (۳). علف کش آترازین با نام علمی (۲-کلرو-۴-اتیل آمینو-۶-ایزو پروپیل آمینو-۱،۵-تریازین) شایع ترین و پرمصرف ترین علف کش خانواده اس-تریازین های

مواد و روش ها

تیمارهای آزمایش شامل دو گونه باکتری سودوموناس فلورسنس (P.F) و سودوموناس آرژینوزا (P.A) و سه سطح غلظت آترازین (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) بود. در این آزمایش محیط کشت نمکهای معدنی

اصلاح شده شامل ۱/۰۴۸ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۹۲۸ گرم

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناس ارشد، استاد و دانشیار گروه علوم خاک،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(* نویسنده مسئول: Email: Danirezaie@yahoo.com)

۴- مسئول بخش آنالیز مرکز تحقیقات علوم دارویی و استاد دانشکده داروسازی

دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۵- کارشناس آزمایشگاه آنالیز مرکز تحقیقات علوم دارویی

باکتری های گوناگونی مورد بررسی قرار داده اند. پاراک و همکاران (۶)، گزارش کردند باکتری آرتروباکتر MCM- B436، ۹۷/۹۸ درصد آترازین (۲۵ میلی گرم در لیتر) را در محیط کشت نمکهای معدنی به عنوان تنها منبع نیتروژن و کربن در مدت ۳۰ ساعت تجزیه کرد. در این آزمایش تاثیر غلظت های گوناگون آترازین بر توان تجزیه کنندگی باکتری های سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا نشان داد که با افزایش غلظت، تجزیه علف کش آترازین به وسیله هر دو گونه سودوموناس به گونه ای معنی دار افزایش یافت. سودوموناس فلورسنس آترازین را در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب ۲۱/۳۳، ۳۰/۶۶ و ۸۲ درصد و سودوموناس آرژینوزا نیز به ترتیب ۱۱/۶۶، ۳۰/۶۶ و ۷۴/۳۳ درصد تجزیه کردند (شکل ۱).

همان گونه که در شکل ۱ مشاهده می شود، بیشترین درصد تجزیه آترازین در غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به وسیله هر دو باکتری صورت گرفته است لیکن سودوموناس فلورسنس توان بیشتری نسبت به سودوموناس آرژینوزا در تجزیه آترازین داشت.

مندلیویم (۵) گزارش کرد که باکتری سودوموناس ADP (تعداد سلول 9×10^9 در میلی لیتر) آترازین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر را در مدت زمان ۹۰ دقیقه کاملاً تجزیه کرد و همچنین این باکتری در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر آترازین در محیط کشت آگار نیز رشد کرد. سینگ و همکاران (۷)، در آزمایشی تجزیه آترازین را بوسیله باکتری اسیتوباکتر بومی خاک های آلوده به علف کش آترازین بررسی کردند. آنها گزارش کردند که این باکتری توان تجزیه آترازین را تا غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر را داشت. با توجه به اینکه آترازین در ساختار شیمیایی خود دارای عنصرهای نیتروژن و کربن می باشد (۵)، با افزایش غلظت و پس از تطبیق باکتری ها با وضعیت موجود، انتظار می رود که باکتری ها از آترازین به عنوان منبع کربن و نیتروژن استفاده کنند. در غلظت کم آترازین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) باکتری ها دارای رشد معمولی خود بوده و از عنصرهای غذایی موجود در محیط کشت استفاده می کنند، لیکن در غلظت های بالای آترازین ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر به دلیل افزایش مقدار آترازین و فراهمی زیاد عنصرهای کربن و نیتروژن، ژن های AtzA، AtzB و AtzC موجود در پلاسمید باکتری ها که مسئول کد کردن آنزیم های تجزیه کننده آترازین می باشند، فعال شده و آترازین را به اسید سیانوریک تبدیل می کنند (۱). مقادیر غلظت های آترازین بکار برده شده در این آزمایش، نه تنها مانع رشد باکتری ها نشد بلکه در کنار عنصرهای غذایی موجود در محیط کشت به عنوان منبع غذایی (کربن و نیتروژن) استفاده شدند که این موضوع در غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر بارزتر بود. با توجه به میکروبی بودن فرایند تجزیه آترازین، افزایش تجزیه سم در غلظت های زیاد را می توان به افزایش قدرت تجزیه کنندگی باکتری ها به دلیل ایجاد تطابق در غلظت های بالا

0.036 ، NaCl گرم 0.036 ، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ گرم 0.036 ، K_2HPO_4 گرم 0.133 ، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ گرم 0.133 ، $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ گرم 0.133 ، $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ و $1/0$ گرم گلوکز در لیتر آب مقطر با pH $6/9$ استفاده شد (۲). انتخاب سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر آترازین با استفاده از روش تست حداقل غلظت بازدارنده (MIC) انجام شد (۴). غلظت های انتخابی از استوک ۱۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر آترازین در متانول تهیه شدند. برای انجام آزمایش، ارلن های حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت در اتوکلاو برای ۱۵ دقیقه در فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد استریل شدند. بعد از سرد شدن محیط های کشت، از استوک ۱۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر آترازین در متانول سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر آترازین تهیه و به محیط های کشت افزوده شدند. در مرحله بعد باکتری های رشد یافته در محیط کشت مایع با دانسیته نوری 0.7 (در طول موج ۶۶۰ نانومتر) و تعداد سلول 1.6×10^8 در هر میلی لیتر، بطور جداگانه به تیمارهای اصلی افزوده شد و ارلن ها در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد در انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت شیک شدند. مقدار ۲ میلی لیتر از نمونه ها در شروع آزمایش و ۴۸ ساعت پس از تلقیح انتخاب و سپس برای مدت ۵ دقیقه با 13000 دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی از فیلتر 0.45 میکرومتر عبور داده شد و مقدار آترازین نمونه ها با دستگاه HPLC قرائت شد.

دستگاه HPLC مدل شیمادزو، مجهز به ستون C18 (طول ۲۵ سانتیمتر) و آشکارساز ماورای بنفش بود. سرعت جریان استفاده شده برابر 0.5 میلی لیتر در دقیقه بود، فاز متحرک با نسبت ۸۰ به ۲۰ متانول (HPLC Grade) به آب مقطر انتخاب شد و طول موج انتخابی در ۲۲۰ نانومتر تنظیم شد. پیک مربوط به علف کش آترازین پس از ۱۲ دقیقه در آشکارساز ظاهر شد. داده های حاصل از آزمایش به وسیله نرم افزار MSTAT-C و مقایسه میانگین داده ها با آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد.

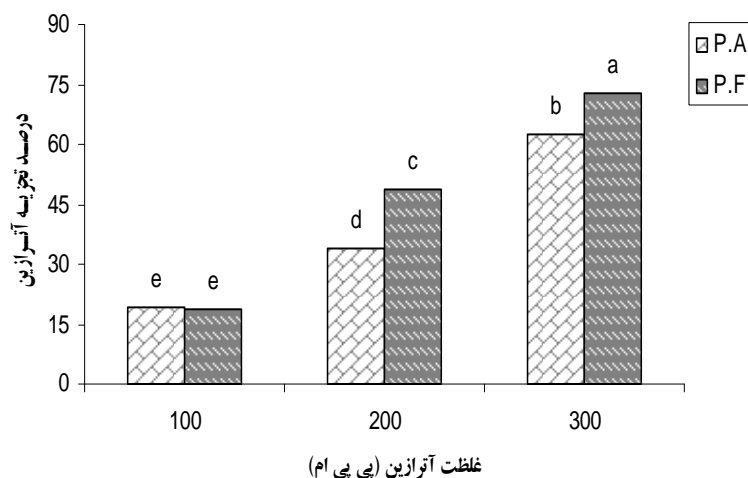
نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از آزمایش نشان داد، آترازین به وسیله هر دو باکتری سودوموناس به طور معنی دار ($P < 0.01$) در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد تجزیه شد، لیکن باکتری سودوموناس فلورسنس توانایی بیشتری در تجزیه آترازین نسبت به سودوموناس آرژینوزا داشت. سودوموناس فلورسنس و آرژینوزا به ترتیب آترازین را ۴۵ و ۳۸/۸۸ درصد در مدت ۴۸ ساعت تجزیه کردند. در این آزمایش مشخص شد که دو گونه دیگر سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا علاوه بر باکتری سودوموناس نژاد (5 ADP)، قابلیت تجزیه آترازین را دارند. در همین راستا پژوهشگران تجزیه آترازین را به وسیله

میلی گرم در لیتر) در این آزمایش را در شرایط آزمایشگاهی داشتند و حتی این باکتری ها توان رشد در غلظت زیاد آترازین ۱۵۰۰ میلی گرم در لیتر در محیط کشت جامد را داشتند. می توان گفت باکتری های سودوموناس می توانند نقش مهمی را در تجزیه آترازین در محیط زیست ایفا کنند. این باکتری ها قادرند که از علف کش آترازین به عنوان منبع غذایی استفاده کنند و این علف کش را از محیط زیست حذف کنند و یا سمیت آن را کاهش دهند.

نسبت داد (۱). گان و همکاران (۳)، گزارش کردند که با افزایش غلظت مقدار آترازین در غلظت های ۵، ۵۰، ۵۰۰ و ۵۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در یک دوره ۲۸۰ روزه انکوباسیون مقدار سم تجزیه شده (وزنی) به ترتیب برابر ۱/۱۲، ۱/۲، ۱۲ و ۱۰۹ میلی گرم در کیلوگرم بوده است که نشان می دهد با افزایش غلظت، مقدار آترازین تجزیه شده همواره افزایش یافته است.

به طور کلی باکتری های سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا توان تجزیه آترازین در غلظت های انتخابی (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰



شکل ۱- درصد تجزیه آترازین در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ قسمت در میلیون به وسیله باکتری های سودوموناس فلورسنس (P.F) و سودوموناس آرژینوزا (P.A)

منابع

- ۱- حق نیاغ. و رضوی ا. ۱۳۸۷. پالایش خاک و آب آلوده به آفت کشها. چاپ اول انتشارات سازمان حفاظت محیط زیست، تهران
- 2- Behiki R. M., and Khan S. U. 1986. Degradation of atrazine by Pseudomonas: N dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. J. Agric. Food Chem. 34:748-749.
- 3- Gan J., Becker R. L., Koskinen W. C., and Buhler D. D. 1996. Degradation of atrazine in two soil as a function of concentration. Journal of Enviro. Qual. 25: 1064-1072.
- 4- Herbicide factsheet, Atrazine: Toxicology. 2001. Journal of Pesticide Reform, 21: No. 2.
- 5- Mandelbaum R. T., Allan D. L. and Wackett L. P. 1995. Isolation and Characterization of a Pseudomonas sp. that Mineralizes the S-Triazine Herbicide Atrazine. Journal of Applied and Environmental Microbiology 61: 1451-1457.
- 6- Parag A. Vaishampayan, Pradnya P. Kanekar, Prashant K. Dhakephalkar. 2007. Isolation and characterization of Arthrobacter sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. Journal of International Biodeterioration & Biodegradation 60: 273-278
- 7- Pooja Singh C.R. Suri, and Swaranjit Singh Cameotra. 2004. Isolation of a member of Acinetobacter species involved in atrazine degradation. Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications 317: 697-702

- 8- Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. *Journal of Pure Appl. Chem.*, 73: No. 7. 1163–1172.
- 9- Yang C., Li Y., Zhang K., Wang X., Ma C., Tang H., and Xu P. 2009. Atrazine degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comamonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium. *Journal of Biodegradation*: 9284-9.