مجله دانشکده بهداشت وانستیتوتحقیقات بهداشتی
بهار ۱۳۹۶، دوره ۱۵، شماره اول، صفحه ۸۲-۷۳

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده سم کلرو پیریفوس از خاک مزارع برنج شهرستان آمل

اسماعیل فتاحی: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران- نویسنده رابط: esmail_fattahy@yahoo.com
ناصر استوار: دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
حامی کابوسی: استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٤/١٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/١٦

چکیده

زمینه و هدف: کلروپیریفوس یک سم ارگانوفسفره است که در کشاورزی برای مبارزه با آفات مورد استفاده قرار می گیرد. کلروپیریفوس سمی نسبتا پایدار و یک آلاینده محیطی است و اثرات مخربی بر سلامت انسان می گذارد. لذا این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده کلروپیریفوس در خاک انجام شد.

روش کار: در این مطالعه آزمایشگاهی، از خاک مزارع برنج با سابقه آلودگی سم نمونه برداری شد. سپس برای جداسازی باکتری های تجزیه کننده سم از محیط کشت حداقل نمکی(Msb) حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کلروپیریفوس به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده شد. کلنی ها با رنگ آمیزی گرم، و آزمایش های بیوشیمیایی و با روش PCR، تعیین توالی و شناسایی گردیدند.

نتایج: در این مطالعه ٤ سویه باکتریایی تجزیه کننده سم کلروپیریفوس در خاک جداسازی شدند. این ٤ سویه شامل *Bacillus licheniformis strain IARI-M-12*، *Bacillus pumilus strain MS42* ، *Bacillus cereus strain ESB15* و *strain Delftia tsuruhatensis SJ113* بودند. در ادامه اثر دما و pH بررسی شد. باکتری های باسیلوس جدا شده در دمای ۳۵ درجه و pH ۷ بیشترین رشد را در محیط کشت Msb حاوی سم کلروپیریفوس نشان دادند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که باکتری های موجود در خاک مزارع قادر به تجزیه سم آلی کلروپیریفوس هستند. لذا استفاده از این باکتری ها می تواند مشکلات زیست محیطی ناشی از سم کلروپیریفوس را در اکوسیستم کاهش دهد.

واژگان کلیدی: باسیلوس، کلروپیریفوس، باکتری تجزیه کننده، کشاورزی

مقدمه

آفت کش ها ترکیبات شیمیایی سنتزی هستند که در کشاورزی برای افزایش بازده تولید مواد غذایی به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیبات سمیت بالایی دارند و اثرات سوء انکارناپذیری بر سلامت اکوسیستم و محیط زیست باقی می‌گذارند. این مواد باعث آلودگی خاک به عنوان پالاینده طبیعی می شوند و نه تنها میکروارگانیسم‌های خاک را از بین برده، باقیمانده‌ی سم را بر روی مواد غذایی باقی می‌گذارند بلکه باعث از هم پاشیدن اکوسیستم طبیعی و از هم گسیختگی زنجیره‌های غذایی، تضعیف سیستم‌های ایمنی یا اغتشاش در عملکرد میکروارگانیسم‌ها می‌گردند (Fattahi et al. 2009; Lakshmi and Khanna 2009). کلروپیریفوس با فرمول شیمیایی $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ یک آفت کش ارگانوفسفره غیرسیستمیک است و به طور گسترده ای در باغات و مزارع کشاورزی، برای کنترل و از بین بردن انواع

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

مختلفی از آفات به کار می رود (Fattahi et al. 2009). استفاده گسترده از کلروپیریفوس موجب آلودگی آب، خاک، رودخانه ها، دریاچه ها و آب باران می شود. حلالیت کلروپیریفوس در آب کم بوده و نفوذپذیری کم و قابلیت بالایی در اتصال با خاک دارد. پایداری این سم بر اساس دما، رطوبت، pH، مواد آلی و شرایط هوادهی خاک متفاوت است و می‌تواند تا چند ماه در محیط باقی بماند (Latifi et al. 2012; Mackay et al. 2014). بهسازی و کاهش آلودگی خاک های آلوده یکی از گام‌های پایه ای در داشتن محیط زیست سالم و پایدار می باشد؛ لذا محققان به دنبال روش مناسبی برای از بین بردن آلودگی محیطی بویژه سموم کشاورزی جهت بهبود شرایط محیطی می باشند. یکی از روش هایی که باعث بازیابی خاک می-شود استفاده از روش تجزیه زیستی با استفاده از میکروب‌ها است که از این طریق باعث تبدیل سموم به ترکیبات غیرسمی می‌شوند. در این فرآیند منبع انرژی و کربن از طریق آفت کش ها تامین می شود (Abo and Aly 2011; Singh and Walker 2006). استفاده از میکروارگانیسم ها برای پاک سازی آلودگی خاک می تواند موثر، ارزان و ایمنی محیطی را فراهم کند. با توجه به تنوع بالای آلاینده های خاک برخی از میکروارگانیسم ها قابلیت سازگار شدن با یک آلاینده را در محیط پیدا می‌کنند و سبب افزایش قابل توجهی در تجزیه زیستی ترکیبات شیمیایی می‌شوند. میکروارگانیسم های زیادی قادر به شکستن پیوند تیو استری در ترکیبات ارگانوفسفره می‌شوند. مدارک و شواهد نشان می‌دهد شکافتگی و معدنی شدن حلقه هتروسیکلیک در خاک به دلیل فعالیت‌های میکروارگانیسم-ها رخ می‌دهد (Bhagobaty and Malik 2008; Kanekar et al. 2004). برخی از مطالعات نشان می-دهد که تعدادی از باکتری‌ها و قارچ ها قادر به تجزیه سموم ارگانوفسفره می‌باشند که از جمله این میکروارگانیسم‌ها می‌توان چندین گونه از قارچ‌ها از قبیل تریکودرما هازیانوم، پنی سیلیوم ورمیکولاتوم، پنی سیلیوم موکور و ساکارمیسس سرویزیه و باکتری‌های پسودوموناس فلورسنس، پسودوموناس آئروژینوزا و باسیلوی سرئوس اشاره نمود (Hastings and Jones 1981; Ghafari et al. 2014; Lal and Lal 1987) با توجه به استفاده گسترده سم کلروپیریفوس در کشاورزی که باعث آلودگی آب، خاک و هوا می شود برخی از باکتری های محیط با این سم سازگار شده و قادر به تجزیه این سم می شوند. لذا شناسایی باکتری-های تجزیه کننده آلاینده‌های کشاورزی به ویژه باکتری‌های بومی اولین گام برای زیست پالایی خاک‌های آلوده به این ترکیبات است. در این راستا، این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های تجزیه کننده خاک های آلوده به سم کلرپیریفوس در شهرستان آمل انجام شد.

روش کار

نمونه برداری خاک: تعداد ۱۰ نمونه خاک در فصل بهار از مزارع برنج شهرستان آمل که حدود یک ماه قبل با سم کلروپیریفوس سمپاشی شده بود جمع آوری گردید. با استفاده از دستکش استریل خاک رویی که حاوی مواد آلی بود کنار زده شد و سپس از عمق صفر تا ۱۵ سانتی متری خاک نمونه برداری انجام شد. این نمونه ها در ظروف استریل جمع آوری و سپس به آزمایشگاه منتقل و مورد استفاده قرار گرفت. سم کلروپیریفوس با درجه خلوص ۹۴٪ از شرکت غزال شیمی بابل تهیه گردید.

جدا سازی باکتری های تجزیه کننده کلروپیریفوس: برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده کلروپیریفوس از محیط کشت حداقل نمکی(Msb) غنی شده با کلروپیریفوس استفاده گردید. در این محیط کشت سم کلروپیریفوس به عنوان منبع تامین کربن و انرژی استفاده شد. محیط کشت حداقل نمکی شامل: پتاسیم نیترات (۲گرم)، منیزیم سولفات ۷ آبه (۰/۲ گرم)، کلرید سدیم (۰/۱ گرم)، کلرید فریک ٦ آبه (۰/۱ گرم)، کلرید منگنز ٤ آبه (۱۰۰ میلی گرم)، کلرید کبالت (۲۰میلی گرم)، سولفات مس (۱۰میلی گرم)، سدیم مولیبدات ۲ آبه (۱۰ میلی گرم)، کلرید روی (۲۰ میلی گرم)، کلرید لیتیم (۵ میلی گرم)، کلرید قلع ۲ آبه (۵ میلی گرم)، اسید بوریک (۱۰ میلی گرم)، برمید پتاسیم (۲۰ میلی گرم)، کلرید

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

باریم (۵ میلی گرم) در هر لیتر محیط و pH=۷ بود. پس از همگن کردن محیط، در دمای ۱۲۱ درجه سیلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد و سپس در دمای اتاق و دور از نور مستقیم نگهداری گردید (Ghafari et al. 2014; Sasikala et al. 2012).

پس از تهیه رقت های سریالی از خاک، یک میلی لیتر از رقت 10^{-3} خاک به ۱۰۰ سی سی محیط کشت حداقل غنی شده با ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سم کلروپیریفوس اضافه گردید و سپس در دمای۵±۳۲ درجه سیلسیوس در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰دور دقیقه به مدت ۷ روز قرار گرفتند. برای جلوگیری از تجزیه نوری سم کلروپیریفوس، ارلن با ورقه آلومینیومی پوشانده شد. میکروارگانیسم‌های که قادر به استفاده از سم کلروپیریفوس به عنوان منبع کربن و انرژی بودند در جدار ارلن به صورت حلقه ای از رشد قابل مشاهده بودند. سپس از این ارلن ها در شرایط آسپتیک نمونه برداری گردید وروی محیط نوترینت آگار داخل پلیت هایی که حاوی محلول نمکی و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر حشره کش کلروپیریفوس بود کشت داده شد. جهت خالص سازی باکتری ها، نمونه های برداشت شده از ارلن ها با روش کشت سفره ای، پور پلیت وکشت خطی، کشت داده شد. انواع کلن ها روی سطح پتری دیش ها ظاهر شده پس از چندین مرحله کشت مکرر سرانجام کلنی های تک حاصل شدند. هرکدام از کلنی های جداگانه روی یک محیط کشت جدید کشت داده شدند (Sasikala et al. 2012; Ghafari et al. 2014).

شناسایی باکتری های تجزیه کننده

روش بیوشیمیایی: در همه پلیت های کشت داده شده، رنگ آمیزی گرم و رنگ آمیزی اسپور و آزمون های بیوشیمیایی ایندول، MR،VP،TSI،اکسیداز، کاتالاز، سیمون سیترات، اوره آز، نیترات و تخمیر قند و حرکت و انجام گردید.

روش مولکولی شناسایی باکتری تجزیه کننده کلروپیریفوس

استخراج ژنوم و انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز: از کلنی-های رشد یافته بر روی محیط کشت برای استخراج DNA استفاده شد. برای این منظور از کیت شرکت سینا ژن و بر اساس دستورالعمل کیت، DNA استخراج شد.سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن *16S rRNA* انجام شد (جدول ۱) (Ghafari et al. 2014).

واکنش زنجیره ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ μl با افزودن ۲x Master mix ،۱۲/۵ μl DNA Template ۵ μl، پرایمرها از هر کدام ۱ μl، آب دیونیزه ۵/۵ μl در ترموسایکلر اپندورف انجام شد. واکنش PCR در شرایط ۳۵ چرخه تکثیر DNA (شامل دناتوراسیون اولیه در۹۴ درجه سیلسیوس به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون ۹۴ درجه سیلسیوس یک دقیقه، اتصال پرایمرها در ۵۹ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه، مرحله طویل شدن در ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه) انجام گردید. سپس محصول حاصل از PCR در ژل آگارز۱ ٪ قرار داده شد. ژل در دستگاه UVidoc قرار داده شد و موقعیت باندها توسط عکس برداری UV ترنس لومیناتور زیر اشعه بررسی گردید. محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد. توالی های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Blast در بانک ژن با دیگر توالیهای موجود در این پایگاه اطلاعاتی مقایسه شدند (Sasikala et al. 2012).

بررسی اثر دما بر روی رشد باکتری های جدا سازی شده در محیط Msb حاوی سم: برای این کار ۱۰۰ میلی لیتر محیط Msb به همراه ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سم خالص کلروپیریفوس در یک ارلن ریخته و پس از اتوکلاو کردن آن،۲ میلی لیتر از باکتری های که در محیط سالین تلقیح شده اضافه کرده و سپس فلاسک ها را در دماهای مختلف (۲۵-۳۵-۴۵-۵۵) به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی برداشته و کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، با استفاده از استاندارد مک فارلند تنظیم شده با دستگاه اسپکتوفتومتر (UV-2100، Rayleiyh، تایوان) در طول موج ۵۶۰ نانومتر با میزان

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

جذب ۰/۱۳–۰/۰۸ انجام گردید و سپس منحنی رشد باکتری ها رسم گردید (Eskandari et al. 2014).

بررسی اثر pH بر روی رشد باکتری های جدا سازی شده در محیط Msb حاوی سم: برای این کار ۱۰۰ میلی لیتر محیط Msb به همراه ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سم در یک ارلن مایر ریخته و پس از اتوکلاوکردن ۲ میلی لیتر از باکتری های که در محیط سالین تلقیح شده اضافه کرده و سپس فلاسک ها را در pH های مختلف (٤و٥ و ٦و٧ و٨) به مدت ٢٤ ساعت نگهداری کردیم. سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی برداشته و کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، با استفاده از استاندارد مک فارلند تنظیم شده با دستگاه اسپکتوفتومتر(UV-2100، Rayleiyh، تایوان) در طول موج ٥٦٠ نانومتر با میزان جذب ۰/۱۳– ۰/۰۸ انجام گردید و سپس منحنی رشد باکتری ها رسم گردید (Eskandari et al. 2014).

بررسی اثر منبع کربن بر روی رشد باکتری های جدا سازی شده در محیط Msb حاوی سم: برای این کار ۱۰۰ میلی لیتر محیط Msb به همراه ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سم در یک فلاسک ریخته و پس از اتوکلاو کردن ۲ میلی لیتر از باکتری های موجود در محیط سالین به آن افزوده، سپس به هر یک از فلاسک‌ها ۱ گرم از منبع کربن مختلف (دکستروز- گلوکز- فروکتوز- گالاکتوز- مانوز) افزوده و آن را به مدت ٢٤ ساعت نگهداری کردیم. سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی برداشته و کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، با استفاده از استاندارد مک فارلند تنظیم شده با دستگاه اسپکتوفتومتر(UV-2100، Rayleiyh، تایوان) در طول موج ٥٦٠ نانومتر با میزان جذب ۰/۱۳–۰/۰۸ انجام گردید و سپس منحنی رشد باکتری ها رسم گردید (Eskandari et al. 2014).

نتایج

جداسازی باکتری های تجزیه کننده کلروپیریفوس: در طی این مطالعه تعداد ٤ سویه باکتری تجزیه کننده سم کلروپیریفوس از خاک های مزارع کشاورزی در شهرستان آمل جداسازی شدند که ویژگی های آنها در جدول ۲ آمده است.

شناسایی مولکولی سویه های تجزیه کننده سم کلروپیریفوس: در این مطالعه ٤ سویه باکتریایی تجزیه کننده سم کلروپیریفوس در خاک جداسازی شدند. این ٤ سویه شامل *Bacillus licheniformis strain IARI-M-12*، *Bacillus pumilus strain MS42* ، *Bacillus cereus strain ESB15* و *Delftia strain SJ113 tsuruhatensis* بودند (شکل ۱، جدول ۳).

بررسی متغیرهای دما، منبع کربن، pH بروی رشد باکتری‌های تجزیه کننده کلروپیریفوس: پس از جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده این سم و شناسایی آنها توسط روش‌های مولکولی و تست‌های بیوشیمیایی، بر روی هر یک از باکتری-ها به طور جداگانه این متغیرها اعمال گردید و رشد باکتری‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (جذب نوری) ثبت گردید (نمودار۱). که این نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS تحلیل گردید. تمامی باکتری های جداسازی شده در روز ٦ حداکثر رشد را داشتند (نمودار۱).

بیشترین رشد دلفتیا تسورهاتنسیس در محیط حداقل نمکی حاوی سم در دمای ٤٥ درجه سیلسیوس و بقیه سویه های جداسازی شده در دمای ۳۵ درجه سیلسیوس بود. همچنین نتایج نشان داد که باسیلوس پومیلوس، باسیلوس لیگنی فورمیس و باسیلوس سرئوس در pH ۷ و دلفتیا تسورهاتنسیس pH ٦ بیشترین رشد را داشتند.

بحث

در مطالعه حاضر چهار سویه مختلف باکتری تجزیه کننده کلروپیریفوس از خاک مزارع کشاورزی شهرستان آمل جداسازی شد. از باکتری های جداسازی شده سه باکتری متعلق به جنس باسیلوس ها و شامل *Bacillus licheniformis strain IARI-M-12*، *Bacillus pumilus strain MS42* و *Bacillus cereus strain ESB15* و یک سویه باکتری مربوط به *Delftia tsuruhatensis strain SJ113* بودند. مطالعات نشان می دهد

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

که گونه های مختلف باکتری ها و قارچ ها قادر به رشد در محیط حاوی سموم آلی فسفره در خاک کشاورزی و باغات می باشند. این باکتری ها از سم در محیط کشت به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و قادر به رشد در محیط حاوی سموم آلی می باشند (Yakimov et al. 2006; Beynon et al. 1973). در سالیان اخیر به دلیل استفاده بی رویه از سم کلروپیریفوس، سمیت و ماندگاری بالا و اثرات سوء انکارناپذیر آن بر سلامت انسان ها و محیط زیست (Racke 1993) سبب شده تا محققان به دنبال روشی مناسب برای کاهش اثرات این ترکیب بر اکوسیستم و محیط زیست شوند. از اینرو استفاده از میکروب ها در تجزیه کلروپیریفوس به عنوان یک روش کم خطر و مقرون به صرفه در این مطالعه مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه غفاری و همکاران در سال ۱۳۹۳ نشان داد که سه سویه مختلف از باکتری های *acillus cereus strain* ،*Pseudomonas fluorescens strain F1، F3* *Pseudomonas aeruginosa strain F4* قادر به تجزیه سم آلی فسفره فنیتروتیون در خاک باغات پسته کرمان بودند(Ghafari et al. 2014). گزارشات مختلفی نشان داده است که انواع مختلفی از باکتری ها و قارچ ها موجود در خاک قادر به تجزیه سم کلروپیریفوس هستند. از این میان باکتری های متعلق به جنس های *Enterobacter* و *Providencia* و قارچ *Fomitiporia mediterranea* گزارش شده است و سویه برتر باکتری *Providencia strain MS09 stuartii* که تا غلظت ۵۰-۷۰۰میلی گرم بر لیتر سم در محیط رشد می کنند (Zhiyuan et al. 2012; Rani et al. 2008) به طور طبیعی میکروب های زیادی در خاک وجود دارند که قادر به استفاده از سم کلروپیریفوس به عنوان منبع کربن هستند و با استفاده از این سم در محیط حداقل نمکی رشد می نمایند. به دلیل همین تنوع بالای میکروارگانیسم است که در مطالعات مختلف سویه های مختلفی را به عنوان باکتری های تجزیه کننده سم کلروپیریفوس معرفی می نمایند. گزارشات برخی از محققان نشان می دهد که سویه های باسیلوس سرئوس (Jiangwei et al. 2010)، باسیلوس لیگنی فورمیس (Cycon et al. 2009) از کلروپیریفوس موجود در محیط حداقل نمکی به عنوان منبع کربن استفاده آن را تجزیه نموده و رشد کردند. یافته های مطالعه حاضر با نتایج این محققین مطابقت دارد. با توجه به اینکه نمونه های خاک مورد استفاده در این مطالعه مدت طولانی آلوده به سم کلروپیریفوس بوده است تنها باکتری هایی که قادر به رشد در این محیط بودند جداسازی شده اند. با توجه به طیف وسیعی از میکروارگانیسم های خاک، انواع مختلفی از میکروب ها در نتایج محققین گزارش شده است که برخی از نتایج سویه های مربوط به این مطالعه را به عنوان تجزیه کننده معرفی نمودند و برخی دیگر سویه های دیگری همانند *Serratia* sp. و *Pseudomonas* sp (Cycon et al. 2009)، *Agrobacterium* sp. (Horne et al. 2002) *Arthrobacter* sp. *P. putida*(Racke 1993) (Goda et al. 2010) را به عنوان تجزیه کننده این سم گزارش داده اند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که باسیلوس پومیلوس، باسیلوس لیگنی فورمیس و باسیلوس سرئوس و دلفتیا تسورهاتنسیس موجود در خاک قادر هستند سم کلروپیریفوس را به عنوان منبع کربن استفاده نمایند. تجزیه ترکیبات شیمیایی همانند سم کلروپیریفوس توسط میکروارگانیسم های خاک یکی از روش های مناسب و حیاتی جهت حذف آلودگی ها و کاهش ماندگاری سم در اکوسیستم می باشد. لذا تجزیه زیستی به عنوان یک روش کم هزینه و کم خطر می تواند جهت حفظ محیط زیست و اکوسیستم بکار رود. هر چند ظرفیت هرکدام از سویه های جداسازی شده در تجزیه این سم متفاوت می باشد لذا بایستی مطالعات بیشتری در خصوص سویه برتر تجزیه کننده سم کلروپیریفوس انجام گیرد.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

حمایت معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت ا... آملی اجرا شده است. همچنین از تمام کسانی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند سپاس گزاری می گردد.

تشکرو قدرانی

این مقاله حاصل پایان نامه در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۹۲ و کد ۲۳۹۳۰۵۱۳۹۱۲۰۰۱ می باشد که با

جدول۱- آغازگرهای عمومی 16S rRNA استفاده شده درانجام PCR

توالی ژن ها ($5' \rightarrow 3'$)
۲۷F: AGAG TTTGATCCTGGCTCAG
۱٤۹۲R: GACGGGCGGTGTGTACAA

جدول ۲- باکتری های تجزیه کننده سم کلروپیریفوس و ویژگی آنها

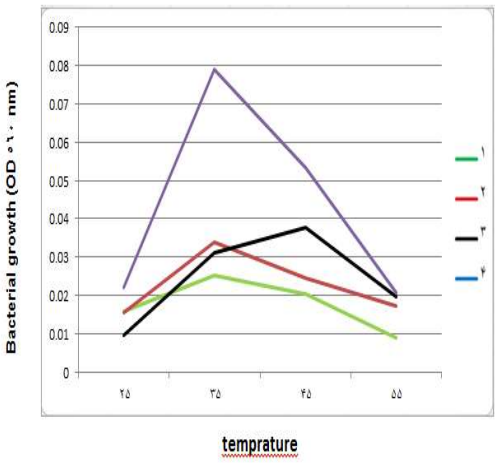
نام سویه	رنگامیزی گرم	رنگامیزی اسپور	حرکت	ایندول	VP	MR	سیمون سیترات	اوره آز	احیای نیترات	کاتالاز	اکسیداز	TSI
F_1	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	−	$\frac{Alk}{Acid}$
F_2	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	−	$\frac{Alk}{Acid}$
F_3	−	−	+	−	−	+	+	−	−	+	+	$\frac{Alk}{Acid}$
F_4	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+	−	$\frac{Alk}{Acid}$

جدول۳- باکتری های جداسازی شده تجزیه کننده سم کلروپیریفوس

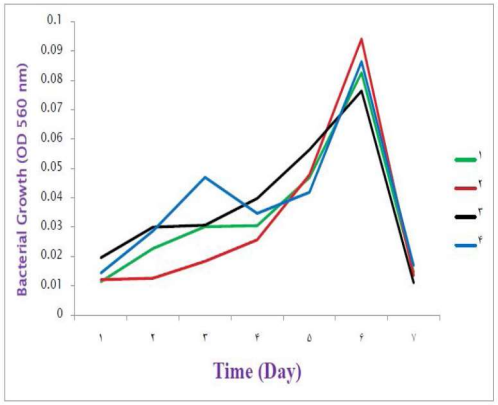
نام سویه	شناسایی سویه	شماره دستیابی	درصد شباهت
F_1	*Bacillus pumilus*	KF۳۱۱۰۹۷,۱	۱۰۰
F_2	*Bacillus licheniformis*	KF۰٥٤۹۷۹,۰	۱۰۰
F_3	*Delftia tsuruhatensis*	GQ۱٤۰۳۲۸,۱	۸٥
F_4	*Bacillus cereus*	KF۳۸۱۳٥۰,۱	۱۰۰

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

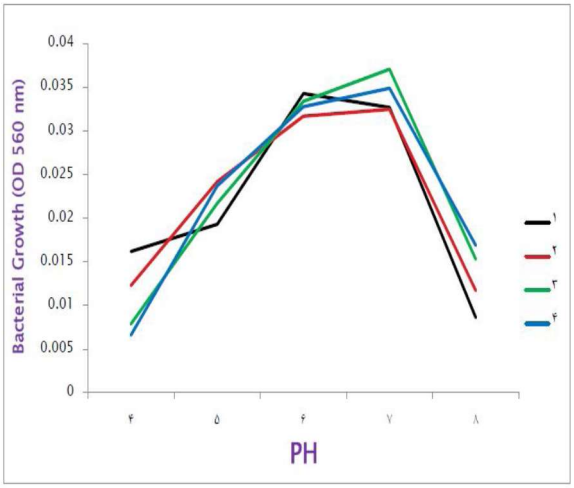
شکل ۱- الکتروفورز DNA استخراج شده از ایزوله های جداسازی شده از نمونه های خاک



الف



ب



ج

نمودار۱- اثر متغیرهای دما، pH و منبع کربن بر رشد باکتری های جداسازی شده سم کلروپیریفوس را نشان می دهد. شماره ۱: باسیلوس پومیلوس، شماره ۲: باسیلوس لیگنی فورمیس، شماره۳: دلفتیا تسورهاتنسیس، شماره ٤: باسیلوس سرئوس

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

References

Fattahi, E., Parivar, K., Jorsaraei, S.G.A. and Moghadamnia, AA., 2009. The effects of diazinon on testosterone, FSH and LH levels and testicular tissue in mice. *Iran J Reprod Med*. 7(2), pp. 59-64.

Lakshmi, CV., Kumar, M. and Khanna, S., 2009. Biodegradation of Chlorpyrifos in Soil by Enriched Cultures. *Curr. Microbiol.* 58, pp. 35-38.

Fattahi, E. Jorsaraei, S.G.A. and Moghadamnia, A.A., 2013. Effects of Dursban on Sexual Hormones and Changes of Testis Tissue in Mice. *J Babol Univ Med Sci.* 15(3), pp. 42-50. [In Persian]

Latifi, A.M., Khodi, S., Mirzaei, M., Miresmaeili, M. and Babavalian, H., 2012. Isolation and characteriza tion of five chlorpyrifos degrading bacteria. *African Journal of Biotechnology.* 11(13), pp. 3140-46.

Mackay, D., Giesy, J.P. and Solomon, K.R., 2014. Fate in the environment and long-range atmospheric transport of the organophosphorus insecticide, chlorpyrifos and its oxon. *Rev Environ Contam Toxicol.* 231, pp. 35-76.

Abo, A. and Aly, E., 2011. Biodegradation of Diazinon by Serratia marcescens DI101 & its use in bioremediation of contaminated Environment. *J. Microbial Biotecnol.* 21(1), pp. 71-80.

Singh, B. and Walker, A., 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev.* 30(3), pp. 428–471.

Bhagobaty, R.K. and Malik, A., 2008. Utilization of chlorpyrifos as a sole source of carbon by bacteria isolated from wastewater irrigated agricultural soils in an industrial area of western Uttar Pradesh. India. *Res. J. Microbiol.* 3, pp. 230-293.

Kanekar, P., Bhadbhade, B., Deshpande, N. and Sanaik, S., 2004. Biodegreadtion of Organophosphorus Pseticides, Proc. *Indian natn Sci Acad.* 70(1), pp. 57-70.

Lal, S. and Lal, R., 1987. Bioaccumulation, metabolism, and effects of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos on Saccharomyces cerevisae. *Arch Environ Contam Toxicol.* 16, pp.753-57.

Jones, A.S. and Hastings, F.L., 1981. Soil microbe studies. In: Hastings F.L., Coster J.E. (eds) Field and laboratory evaluations of insecticides for southern pine beetle control. USDA. Southern Forest Experiment Station, Forest Service, SE. 21, pp. 13-14.

Ghafari, M., Hasanshahian, M. and Mahani, M., 2014. Isolation and characterization of Fenitrothion-degrading bacteria from pestachio gardens in Kerman Provinance. *Biological Journal of Microorganism.* 10(3), pp. 51-64. [In Persian]

Sasikala, C., Jiwal, S., Rout, P. and Ramya, M., 2012. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(3), pp. 1301-1308.

Eskandari, S., Hoodeji, M. and Thamorespour, A., 2014. Biodegradation of Phenol by Indigenous Bacterium Isolated from Contaminated Soil of Esfahan Steel Company Zone. 4, *Journal of Water and Wastewater.* pp. 66-73. [In Persian]

Yakimov, M.M., Cappello, S., Crisafi, E. and Tursi, A., 2006. Phylogenetic survey of metabolically active microbial communities associated with the deep-sea coral Lophelia pertusa from the Apulian Plateau, Central Mediterranean Sea. *Deep Sea Res. Part I.* 53, pp. 62-75.

Beynon, K., Hutson, D. and Wright, A., 1973. The metabolism & degradation of Vinyl phosphate insecticides; *Res. Rev.* 47, pp. 55-142.

Racke, K.D., 1993. Environmental Fate of Chlorpyrifos. Rev. Environ. *Contamin. Toxicol.* 131, pp. 1-150.

Singh, B.K. Allan, S., Walker, A., Alun, J., Morgan, W. and Denis, J., 2004. Biodegradation of Chlorpyrifos by Enterobacter Strain B-14 and Its Use in

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

Bioremediation of Contaminated Soils. Appl. *Environ. Microbiol.* 70, pp. 4855-4863.

Rani, M.S., Lakshmi, K.V., Devi, P.S., Madhuri, R.J., Aruna, S., Jyothi, K., Narasimha, G. and Venkateswarlu, K., 2008. Isolation and characterization of chlorpyrifos degrading bacterium from agricultural soil and its growth response. *AFR J. Microbiol. Res.* 2, pp. 26-31.

Zhiyuan, L., Xin, Chen. Yi, Shi. and ZhenCheng, Su., 2012. Bacterial Degradation of Chlorpyrifos by Bacillus cereus. *Advanced Materials Research.* 356-360, pp. 676-680.

Jiangwei, Zhu. Yan, Zhao. and Jiangping, Qiu1., 2010. Isolation and application of a chlorpyrifos-degrading Bacillus licheniformis ZHU-1. *African Journal of Microbiology Research.* 4(22), pp. 2410-2413.

Cycon, M., Wojcik, M. and Piotrowska-seget, Z., 2009. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by serratia sp. And Pseudomonas sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere.* 76, pp. 494-501.

Horne, I., Sutherland, T.D., Harcourt, L.R., Russell, R.J. and Oakeshott, J.G., 2002. Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an Agrobacterium isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, pp. 3371-3376.

Goda, S.K., Elsayed, I.E., Khodair, T.A., El-Sayed, W. and Mohamed, M.E., 2010. Screening for and isolation and identification of malathion-degrading bacteria: cloning and sequencing a gene that potentially encodes the malathion-degrading enzyme, carboxylestrase in soil bacteria. *Biodegradation.* 21, pp. 903-913.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]

Isolation and Characterization of Chlorpyrifos-Degrading Bacteria from Rice Field Soils in Amol City, Iran

Fattahi, E., Ph.D. **Assistant Professor, Department of Biology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran-Corresponding Author: esmail_fattahy@yahoo.com**
Ostovar, N., **MSc. Student, Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran**
Kaboosi, H., Ph.D. **Assistant Professor, Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran**
Received: Jul 5, 2016 Accepted: Feb 5, 2017

ABSTRACT

Background and Aim: Chlorpyrifos is an organophosphate pesticide used in agriculture for pest control. It is a relatively persistent poison and an environmental pollutant with adverse effects on human health. This study was conducted to isolate and characterize chlorpyrifos-degrading bacteria from rice field soils in Amol City, Iran.

Materials and Methods: In this experimental study, soil samples were collected from rice fields with a history of toxic pollution. A minimal salt broth (Msb) medium containing 100 mg/l chlorpyrifos as the carbon and energy source was used for isolating pesticide-degrading bacteria. The colonies were characterized by Gram staining and biochemical tests and sequencing was done using the PCR method.

Results: Four chlorpyrifos-degrading bacterial strains were isolated from the soils. They included *Bacillus licheniformis strain IARI-M-12*, *Bacillus pumilus strain MS42, Bacillus cereus strain ESB15,* and *Delftia tsuruhatensis strain SJ113*. The effects of temperature and pH on the bacterial strains were investigated. The *Bacillus* strains showed the fastest growth at a temperature of 35° C and a pH=7 in a Msb medium containing chlorpyrifos.

Conclusion: The results of this study demonstrate that bacteria in the farmland can degrade the chlorpyrifos poison. Thus, these bacteria can be used to reduce the environmental problems resulting from soil contamination with chlorpyrifos in the ecosystem.

Keywords: Bacillus, Chlorpyrifos, Biodegradation, Agriculture

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2025-04-20]