نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۰، ص.۸۰۶-۷۹۹

Journal of Water and Soil
Vol. 25, No.4, Sep-Oct 2011, p. 799-806

مطالعه تجزیه علف‌کش آترازین به وسیله باکتری‌های سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا به عنوان منبع نیتروژن و کربن در شرایط آزمایشگاهی

دانیال رضایی[1*]- غلامحسین حق‌نیا[2]- امیر لکزیان[3]- محمد حسن زاده خیاط[4]- حوریه نصیرلی[5]

تاریخ دریافت:۸۹/۴/۱۶
تاریخ پذیرش:۹۰/۴/۱۳

چکیده

تجزیه زیستی آترازین به وسیله باکتری‌ها به عنوان یکی از روش‌های مهم زیست پالایی مطرح می‌باشد. تجزیه این علف‌کش به وسیله باکتری‌ها از جنس‌های گوناگونی گزارش شده است. باکتری‌ها معمولا آترازین را به عنوان منبع نیتروژن و کربن استفاده می‌کنند. هدف این مطالعه بررسی تجزیه آترازین به وسیله باکتری‌های سودوموناس فلورسنس (P.F) و سودوموناس آرژینوزا (P.A) در شرایط آزمایشگاهی بوده است. آزمایش در قالب کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل دو گونه باکتری (سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا)، سه سطح غلظت آترازین ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ (میلی‌گرم در لیتر) و چهار نوع محیط کشت نمکهای معدنی (کامل، بدون نیتروژن، بدون کربن و بدون نیتروژن و کربن) بود. نتایج بدست آمده از آزمایش نشان داد که هر دو باکتری توان تجزیه آترازین در هر سه غلظت در بازه زمانی ۴۸ ساعت را داشتند. لیکن با افزایش غلظت آترازین مقدار بیشتری از آن تجزیه شد. در سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر تجزیه آترازین برای باکتری سودوموناس فلورسنس به ترتیب ۱۸/۵، ۴۸/۹۱ و ۷۲/۶ درصد و برای باکتری سودوموناس آرژینوزا ۱۹/۰۸، ۳۳/۸۳ و ۶۲/۶۶ درصد بود. در تیمار محیط کشت بدون نیتروژن بیشترین تجزیه به وسیله سودوموناس فلورسنس روی داد که تفاوت معنی‌داری با دیگر محیط‌های کشت داشت. در این آزمایش حضور نیتروژن عامل محدود کننده‌ای در تجزیه آترازین به‌وسیله باکتری سودوموناس فلورسنس بود. لیکن فاکتور نیتروژن تفاوت معنی‌داری درتجزیه آترازین به وسیله سودوموناس آرژینوزا درمقایسه با دیگر محیط‌های کشت نداشت.

واژه‌های کلیدی: آترازین، تجزیه زیستی، سودوموناس آرژینوزا، سودوموناس فلورسنس

مقدمه

آفت‌کش‌ها تقریبا در سراسر کشتزارهای جهان به منظور افزایش تولید در واحد سطح به کار می‌روند. بطور کلی آفت‌کش‌ها به عنوان ابزاری برای تولید بیشتر غذا و تامین نیازهای غذایی جمعیت در حال رشد جهان توسعه و کاربرد زیادی یافته‌اند. اما 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 می‌روند (۳).

آترازین یکی از علف‌کش‌هایی است که در سطح گسترده به وسیله کشاورزان استفاده می شود. این علف‌کش که از خانواده علف‌کش‌های اس-تریازین‌های متقارن است، در مزارع ذرت، سورگوم و نیشکر در کشورهای گوناگون از جمله ایران استفاده می‌شود (۲۱). آترازین به دلیل تجزیه زیستی کند و پتانسیل بالا برای آلوده کردن آبهای سطحی و زیرزمینی به عنوان یک آلاینده زیست محیطی مطرح است (۲۴). به سبب پویایی زیاد آن، غلظت‌های چشمگیری از آترازین (بیش از ۳ میکروگرم در لیتر) در آبهای زیر زمینی مناطق مختلف گزارش شده است. این علف‌کش دارای سمیت شدید برای جانداران آبهای شیرین و رودخانه‌ها می‌باشد (۱۹). آترازین در غلظت‌های گوناگون به وسیله فرآیندهای شیمیایی و میکروبی قابل تجزیه بوده و نیمه عمر آن در خاک بین ۳۷ تا ۱۶۸ روز برآورد شده است. این ماده جزء سموم نسبتا مقاوم است و با افزایش غلظت، پایداری آن در خاک نیز افزایش می‌یابد (۳). انحلال پذیری این علف‌کش در آب ۳۰ میلی‌گرم در لیتر می باشد و پویایی آن در خاک‌هایی که مقدار رس یا ماده آلی کمی دارند، نسبتا زیاد است.

۱،۲و۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email:danirezaie@yahoo.com)
۴- استاد دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۵- کارشناس آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

کشاورزان معمولا آترازین را به تنهایی و یا همراه با آلاکلر مصرف می‌کنند (۱۵). بر اساس آمار موجود در حفظ نباتات ایران مصرف این علف‌کش در سال ۱۳۸۶ در حدود۲۵۰ تن است و میانگین مصرف آن ۱ تا ۵ کیلوگرم در هکتار بوده است (۱).

تجزیه زیستی مهمترین و موثرترین راه برای نابودی آفت‌کش‌ها در محیط بشمار می‌رود. تجزیه زیستی آفت‌کش‌ها فرآیند زیست محیطی فراگیری است که در زیستگاههای گوناگونی از جمله خاک، ته‌نشست‌ها، آبهای سطحی و زیرزمینی، لجن‌های فاضلاب و دیگر موارد مشابه انجام پذیر است. همه آفت‌کش‌ها بالقوه به یک یا چند نوع تغییر شکل زیستی حساس‌اند (۳). در فرآیند تجزیه زیستی، مولکول‌های آفت‌کش به وسیله آنزیم‌های برون یاخته‌ای ریزجانداران تخریب شده و به مولکول‌های کوچکتر و یا اجزای معدنی خود تبدیل می‌شوند. معدنی شدن کامل آفت‌کش‌ها به ندرت رخ می‌دهد و فرآورده‌های تولید شده، در بدن ریزجانداران انباشته شده و ممکن است برای آنها سمیت ایجاد کند. باکتریها، قارچها، اکتینومیستها و جلبکها ریزجانداران اصلی تشکیل دهنده خاک هستند که در بین آنها قارچها و باکتریها نقش اصلی را در تجزیه زیستی و متابولیسم میکروبی آفت‌کش‌ها دارند (۱). پژوهشگران گزارشهایی از تجزیه آترازین به وسیله باکتری ها مانند جنس‌های سودوموناس، رودوکوکوس، اسینتوباکتر، خانواده ائروباکتریوم، میکروباکتریوم، باسیلوس، میکروکوکوس، دینوکوکوس و دلفتیا اسیدوورانس، همچنین جنس‌های ترکیبی مانند اگروباکتریوم تومیفاسینز، کایلوباکتر کرسنتوس، سودوموناس پوتیدا، گونه‌های رایزوبیوم، گونه‌های نوکاردیا ارائه کرده‌اند (۲۴). بر پایه پژوهش‌های انجام شده، باکتری‌های سودوموناس به دلیل قابلیت‌هایشان در تجزیه آلاینده‌های آلی از جمله مشتقات نفتی، هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک، علف‌کش‌ها و دیگر آلاینده‌ها در تحقیقات پژوهشی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۱۰). تاکنون در پژوهشهای انجام شده روی خانواده سودوموناس‌ها، جنس سودوموناس ADP، شناخته شده‌ترین آنها در تجزیه کامل آترازین می‌باشد. گونه‌های سودوموناس از آترازین به‌عنوان منبع نیتروژنی استفاده می‌کنند (۱۹). از دیگر باکتری‌های سودوموناس که در پژوهشهای زیست محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان به باکتری‌های سودوموناس آرژینوزا[1] و سودوموناس فلورسنس[2] اشاره کرد.

هدف از این پژوهش، مطالعه تجزیه آترازین در غلظت‌های گوناگون به‌وسیله باکتری‌های سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا به عنوان منبع نیتروژن و کربن و همچنین تجزیه این علف-کش در حضور منابع نیتروژن و کربن در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش ها

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل دو گونه باکتری سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آرژینوزا، سه سطح غلظت آترازین (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و چهار نوع محیط کشت نمکهای معدنی[3] شامل محیط کشت MSM کامل، محیط کشت MSM بدون نیتروژن، محیط کشت MSM بدون کربن و محیط کشت MSM بدون نیتروژن و کربن بود. علف‌کش آترازین با خلوص ۹۹/۵ درصد از شرکت آلمانی دکتر ارنسفورفر (GmbH) خریداری شد. باکتری سودوموناس فلورسنس از کلکسیون گروه بیماری‌های گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و سودوموناس آرژینوزا از گروه میکروبیولوژی دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، تهیه شدند.

محیط کشت نمکهای معدنی اصلاح شده شامل ۱/۰۴۸ گرم KH_2PO_4، ۰/۹۲۸ گرم K_2HPO_4، ۰/۶۰۸ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۰۳۶ گرم NaCl، ۰/۰۳۶ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۱۲۴ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۱۳ گرم $FeCl_3.6H_2O$ و ۱/۰ گرم گلوکز در لیتر آب مقطر با pH ۶/۹ استفاده شد (۵) و آگار نیز به مقدار ۱۵ گرم در لیتر برای تهیه محیط کشت جامد به محیط کشت نمکهای معدنی اضافه شد. سه استوک برای جلوگیری از رسوب عناصر معدنی در محیط کشت تهیه شد، که در جدول ۱ نشان داده شده است. انتخاب سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آترازین با استفاده از روش تست حداقل غلظت بازدارنده[4] (MIC) انجام شد (۹). غلظت های انتخابی از استوک ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آترازین در متانول تهیه شدند.

جدول ۱- محیط کشت MSM

MSM Medium Stocks		
Stocks	**Elements**	**g.l^{-1}**
Stock 1	KH_2PO_4	10.48
	K_2HPO_4	9.28
	$(NH_4)_2SO_4$	6.08
Stock 2	NaCl	0.368
	$CaCl_2.2H_2O$	0.368
	$MgSO_4.7H_2O$	1.248
Stock 3	$FeCl_3.6H_2O$	0.132

مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت در ارلن ۱۰۰ میلی لیتری برای

1 -*Pseudomonas aeruginosa*

2 -*Pseudomonas fluorescence*

3 -Mineral Salt Medium (MSM)

4 -Minimum Inhibitory Concentration

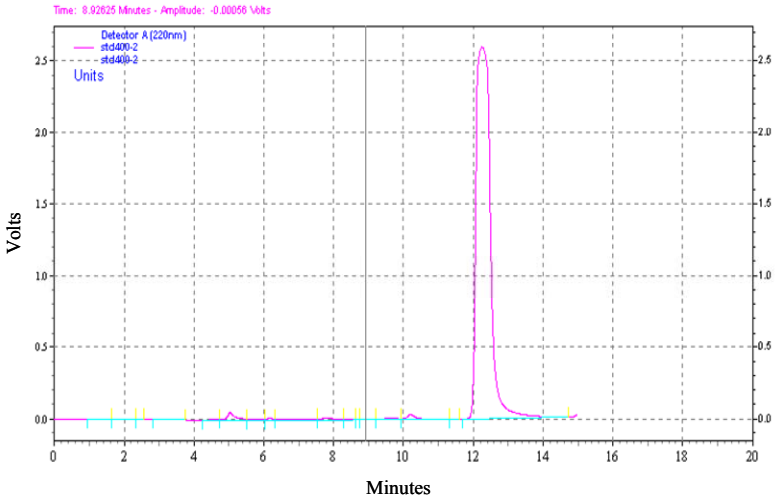
هر تیمار تهیه شد، سپس محیطهای کشت در اتوکلاو برای ۱۵ دقیقه در فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد استریل شدند. بعد از سرد شدن محیطهای کشت، از استوک ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آترازین در متانول سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آترازین تهیه و با پیپت حبابدار به ترتیب ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌لیتر در وضعیت استریل به محیطهای کشت افزوده شدند. در مرحله بعد باکتری‌ها به محیطهای کشت مایع تلقیح شدند. برای این منظور ابتدا از باکتری‌های بازکشت شده در محیط کشت اختصاصی سودوموناس (King B) برداشته و در محیط کشت جامد MSM حاوی غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آترازین بازکشت شدند. سپس باکتری‌های رشد یافته روی پلیت به محیطهای کشت مایع تلقیح شدند و ارلن‌ها در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و در شیکر چرخشی با ۱۵۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. هنگامی که دانسیته نوری باکتریها (در طول موج ۶۶۰ نانومتر) به ۰/۷ رسید، مقدار معینی از مایع تلقیحی باکتری‌های سودوموناس فلورسنس و آرژینوزا ($۱/۶\times۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی لیتر) بطور جداگانه به تیمارهای اصلی افزوده شد و ارلن‌ها در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت شیک شدند. مقدار ۲ میلی لیتر از نمونه‌ها در شروع آزمایش و ۴۸ ساعت پس از تلقیح انتخاب و سپس برای مدت ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و مقدار آترازین نمونه‌ها با دستگاه HPLC قرائت شد.

دستگاه HPLC مدل شیمادزو، مجهز به ستون C18 (طول ۲۵ سانتیمتر) و آشکارساز ماورائ بنفش بود. سرعت جریان استفاده شده برابر ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود و فاز متحرک با نسبت ۸۰ به ۲۰ متانول (HPLC Grade) به آب مقطر انتخاب شد و طول موج انتخابی در ۲۲۰ نانومتر تنظیم شد (۱ و ۲۶). پیک مربوط به غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر استاندارد آترازین پس از ۱۲ دقیقه در آشکارساز مطابق شکل ۱ ظاهر شد.

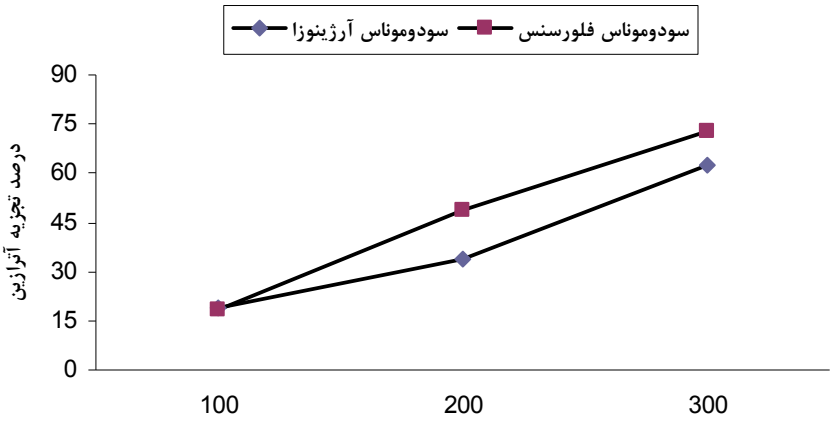
آنالیز واریانس داده‌های بدست آمده از اندازه‌گیری غلظت باقیمانده علف‌کش آترازین در محیطهای کشت مایع MSM، به وسیله نرم افزارهای M-STATC به صورت فاکتوریل و برمبنای طرح کاملا تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام شد و نمودارها به وسیله نرم افزار اکسل ۲۰۰۷ ترسیم شدند.

نتایج و بحث

آترازین به وسیله هر دو گونه سودوموناس در بازه زمانی ۴۸ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد تجزیه شد. نتایج بدست آمده از آزمایش نشان داد که توانایی باکتری سودوموناس فلورسنس در تجزیه آترازین بیشتر از سودوموناس آرژینوزا بود، به گونه‌ای که سودوموناس فلورسنس ۴۵ درصد و سودوموناس آرژینوزا ۳۸/۸۸ درصد آترازین را در بازه زمانی ۴۸ ساعت در شرایط آزمایش تجزیه کردند. پژوهشگران دیگر نیز گزارشهایی مبنی بر توان باکتری‌های سودوموناس در تجزیه آترازین ارائه کرده‌اند. بهیکی (۶)، گزارش کرد که جنس‌های سودوموناس توانایی رشد در محیط کشت حاوی آترازین از طریق فرایند اکسایش زنجیره های آلکیل در مدت زمان ۳۰ روز را داشتند. همچنین مندلبیوم (۱۹)، در مطالعه‌ای نشان داد که گونه سودوموناس نژاد ADP دارای بیشترین توانایی در معدنی کردن آترازین می‌باشد.



شکل ۱- منحنی باززایی آترازین در دستگاه HPLC، استاندارد ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر



شکل ۲- مقایسه میانگین برهمکنش‌های باکتری‌های سودوموناس و غلظت آترازین

تجزیه آترازین در غلظت‌های گوناگون نشان داد که با افزایش غلظت آترازین، تجزیه آن به گونه‌ای معنی‌دار به وسیله هر دو گونه سودوموناس افزایش یافت. سودوموناس فلورسنس آترازین را در سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۱۸/۵، ۴۸/۹۱ و ۷۲/۶ درصد و سودوموناس آرژینوزا نیز به ترتیب ۱۹، ۳۳/۸۳ و ۶۲/۶۶ درصد در بازه زمانی ۴۸ ساعت تجزیه کردند (شکل ۲). یانگ و همکاران (۲۶) گزارش کردند که مجموعه باکتریهای کلبسیلا و کوماموناس می توانند مقدار ۸۳/۳ درصد از آترازین را در محیط کشت حاوی ۵ گرم در لیتر در مدت ۲۴ ساعت تجزیه کنند. مندلبیوم (۱۹) گزارش کرد که باکتری سودوموناس ADP (تعداد سلول ۹×۹^{۱۰} در میلی‌لیتر) آترازین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر را در بازه زمانی ۹۰ دقیقه کاملا تجزیه کرد و همچنین این باکتری در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آترازین در محیط کشت آگار نیز رشد کرد. سینگ و همکاران (۲۲)، نیز در آزمایشی تجزیه آترازین را در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. آنها نشان دادند باکتری اسینتوباکتر دارای توان تجزیه آترازین با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر را داشت.

در بررسی حاضر مشاهده شد کمترین درصد تجزیه آترازین در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و بیشترین در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به وسیله هر دو گونه سودوموناس صورت گرفت. همان گونه که در شکل ۲ دیده می‌شود، با افزایش غلظت، تجزیه آترازین به وسیله هر دو گونه سودوموناس افزایش می‌یابد. همچنین در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر، سودوموناس فلورسنس در مقایسه با سودوموناس آرژینوزا به گونه‌ای معنی‌دار توانایی بیشتری در تجزیه آترازین داشت.

با توجه به اینکه آترازین[1] در ساختار شیمیایی خود دارای عنصرهای نیتروژن و کربن می باشد (۱۴)، با افزایش غلظت و پس از تطبیق باکتری‌ها با شرایط موجود، آنها از آترازین به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن استفاده می کنند (۶). در غلظت کم آترازین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باکتری‌ها دارای رشد معمولی خود بوده و از عناصر غذایی موجود در محیط کشت استفاده می کنند، لیکن در غلظت‌های بالای آترازین ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به دلیل افزایش مقدار آترازین و فراهمی زیاد عنصرهای کربن و نیتروژن، ژن‌های AtzA، AtzB و AtzC موجود در پلاسمید باکتری‌ها که مسئول کد کردن آنزیم‌های تجزیه کننده آترازین می باشند، فعال شده و آترازین را به اسید سیانوریک تبدیل می‌کنند (۳ و ۲۳). این مقادیر غلظت‌های آترازین نه تنها مانع رشد باکتری‌ها نشد بلکه در کنار عناصر غذایی موجود در محیط کشت به عنوان منبع غذایی (کربن و نیتروژن) استفاده شدند که این موضوع در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بارزتر بود. با توجه به میکروبی بودن فرایند تجزیه آترازین، افزایش تجزیه سم در غلظت-های زیاد را می‌توان به افزایش قدرت تجزیه کنندگی باکتری‌ها به دلیل ایجاد تطابق در غلظت‌های بالا نسبت داد (۳).

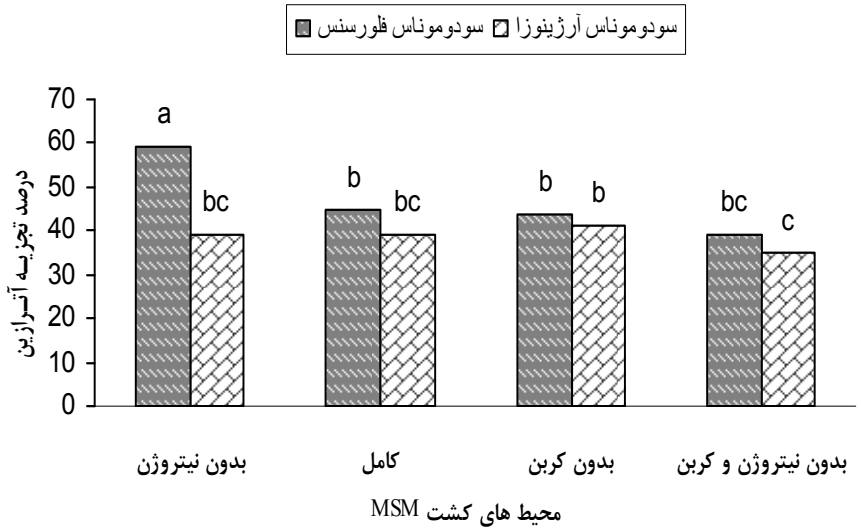
تجزیه آترازین در چهار محیط کشت MSM کامل، محیط کشت MSM بدون نیتروژن، محیط کشت MSM بدون کربن و محیط کشت MSM بدون نیتروژن و کربن به وسیله هر دو گونه سودوموناس مورد بررسی قرار گرفت. سودوموناس فلورسنس در محیط کشت MSM بدون نیتروژن، در بازه زمانی ۴۸ ساعت ۵۹ درصد آترازین را تجزیه کرد که بیشترین تجزیه نسبت به سایر محیط‌های کشت بود. بدین صورت که تجزیه در محیط‌های کشت

1 -$C_8H_{14}ClN_5$

MSM کامل، MSM بدون کربن و MSM بدون کربن و نیتروژن به ترتیب ۴۴/۶۶، ۴۴ و ۳۹/۱۱ درصد در مدت ۴۸ ساعت بود (شکل ۳). در این آزمایش همچنین تاثیر نیتروژن (سولفات آمونیوم) بر عملکرد تجزیه آترازین به وسیله باکتری‌ها بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که نیتروژن عامل محدود کننده در تجزیه آترازین به وسیله سودوموناس فلورسنس می‌باشد و در نبود نیتروژن باکتری از آترازین به عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کند و آترازین بیشتری تجزیه می‌شود.

تاثیر نیتروژن اختلاف معنی‌داری در تجزیه آترازین به وسیله باکتری سودوموناس آرژینوزا نداشت. به گونه‌ای که در محیط کشت بدون کربن، آترازین ۴۱ درصد تجزیه شد و در محیط‌های کشت MSM بدون نیتروژن، MSM کامل و MSM بدون نیتروژن و کربن مقدار آترازین تجزیه شده به ترتیب ۳۹/۳۳، ۳۸/۸۸ و ۳۴/۸۸ درصد در مدت ۴۸ ساعت بود (شکل ۳).

هانتر و شانر (۱۵)، در آزمایشی نقش نیتروژن اضافی (نیترات) را بر روی تجزیه آترازین در حضور روغن گیاهی به‌عنوان مانع زیستی در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. نتایج نشان داد هنگامی که نیترات در محیط حضور ندارد، تجزیه آترازین در طول ۳۲ هفته، از ۱ میلی‌گرم در لیتر به ۰/۰۳۱ میلی‌گرم در لیتر رسید، یعنی ۹۷ درصد تجزیه صورت گرفته است لیکن درصد تجزیه آترازین در همین شرایط آزمایشگاهی با حضور ۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات، بعد از ۳۵ هفته به ۴۱ درصد رسید. در مطالعه‌ای دیگر باکتری سودوموناس نژاد ADP در مدت ۱۴ روز بیش از ۵۰ درصد آترازین را در وضعیت هوازی و بی‌هوازی تجزیه کرد، اما حضور زیاد نیترات در محیط مایع مانع معدنی شدن به وسیله باکتری آترازین شد (۷). عبدل هافید و همکاران (۴) در پژوهشی تاثیر کربن و نیتروژن اضافی (معدنی و آلی) بر تجزیه آترازین در خاک را بررسی کردند. آنها نشان دادند همه ترکیبات نیتروژنی معدنی شدن آترازین را به گونه‌ای معنی‌دار کاهش می‌دهند. همچنین معدنی شدن آترازین در حضور ترکیبات کربنی گلوکز، سلولز، کاه و کمپوست در بازه زمانی ۱۴ روز به ترتیب ۸/۹، ۳۱/۵، ۵۹/۲ و ۶۳/۵ درصد بود که نسبت به شاهد (۹۰ درصد) اختلاف معنی‌داری نشان داد. همچنین معدنی شدن آترازین در حضور ترکیبات کربنی گلوکز، سلولز، کاه و کمپوست در مدت ۱۴ روز به ترتیب ۸/۹، ۳۱/۵، ۵۹/۲ و ۶۳/۵ درصد بود که نسبت به شاهد (۹۰ درصد) تفاوت معنی‌داری داشت. اما مطالعات بعضی از پژوهشگران درمورد نقش نیتروژن نتیجه‌ای معکوس داشت. در آزمایشی یانگ و همکاران (۲۶)، اثرات کودهای نیتروژن اوره، کربنات آمونیوم و فسفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن بر معدنی شدن آترازین به وسیله مجموعه‌ای از باکتری‌های کلبسیلا و کوماموناس مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایش نشان داد که این مجموعه باکتری‌ها بر خلاف دیگر باکتری‌ها، به کودهای نیتروژن غیرحساس بودند و معدنی شدن آترازین در دو غلظت ۲۰۰ میلی گرم و ۵ گرم در لیتر به وسیله دو باکتری در مدت ۲۴ ساعت در حضور کودهای نیتروژن اختلاف معنی‌داری با شاهد (آترازین تنها منبع نیتروژن) نداشت.



شکل ۳- مقایسه میانگین برهمکنش باکتری‌های سودوموناس و محیط‌های کشت MSM بر تجزیه آترازین

در این آزمایش حضور و عدم حضور کربن تاثیر معنی‌داری بر تجزیه آترازین به وسیله دو جنس باکتری سودوموناس نداشت. اما نتایج آزمایش نشان داد که هر دو جنس باکتری سودوموناس قادر بودند که از آترازین به عنوان منبع کربن استفاده کنند. در کل، باکتری سودوموناس فلورسنس توانایی تجزیه بیشتری نسبت به سودوموناس آرژینوزا داشت. اما پژوهشگران نتایج گوناگونی از مصرف آترازین به عنوان منبع کربن به وسیله ریزجانداران بدست آورده‌اند. کنت چو و اسچیونید (۱۸) در مطالعه‌ای گزارش کردند که باکتری سودوموناس جدایه YAYA6 قادر به معدنی کردن آترازین به عنوان منبع کربن می‌باشد. همچنین این دو پژوهشگر در مطالعه‌ای دیگر تجزیه زیستی ترکیبات اس-تریازین (آترازین، سیمیازین، هیدروکیسی آترازین و تربیوتیلازین) را به وسیله ترکیبی از باکتری‌های تجزیه کننده که در محیط کشت BMA حاوی آترازین به عنوان تنها منبع کربن رشد یافته بودند، در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. نتایج نشان داد که باکتری‌ها قادر به تجزیه آترازین و دیگر اس-تریازین‌ها بودندکه به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده شدند. گش و فیلیپ (۱۱) در آزمایشی تجزیه زیستی آترازین را به وسیله باکتری‌های بی‌هوازی بررسی کردند. نتایج نشان داد که تجزیه آترازین در حضور منبع کربن (دکستروز) به وسیله باکتری‌ها نسبت به تیمارهایی که تنها منبع کربن و نیتروژن آترازین بود، بیشتر بود.

بطور کلی باکتری‌های سودوموناس به دلیل داشتن ژن‌های کد کننده آنزیم‌های تجزیه کننده آترازین قابلیت تجزیه این سم را در غلظت‌های گوناگون در حضور و عدم حضور منابع نیتروژن و کربن داشتند، و این توانایی در باکتری سودوموناس فلورسنس در مقایسه با سودوموناس آرژینوزا بارزتر بود. این باکتری‌ها قادرند که از علف‌کش آترازین به عنوان منبع غذایی استفاده کنند و در غلظت‌های زیاد این علف‌کش زنده بمانند و رشد کنند و سمیت آن را در محیط کاهش دهند. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که نیتروژن می تواند نقش مهمی در تجزیه آترازین به وسیله باکتری‌ها ایفا کند. به گونه‌ای که نبود آن مقدار آترازین تجزیه شده را افزایش می‌دهد. از این رو احتمال می‌رود برای حذف این علف‌کش در محیط مزرعه، با مدیریت کودی مناسب بتوان حداکثر راندمان را برای حذف آترازین به وسیله ریزجاندارن بدست آورد.

منابع

۱- ایزدی ا. ۱۳۸۷. بررسی ماندگاری آترازین در شرایط گلخانه و مزرعه‌ای و تاثیر آن بر فعالیت میکروبی خاک و زیست بوم‌های زراعی. پایان نامه دوره دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- رنجبر ا. ۱۳۸۴. تاثیر پالاینده‌های آلی و نیتروژن معدنی بر تجزیه زیستی و شیمیایی آترازین در خاک. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

۳- حق نیا غ.، رضوی ا. ۱۳۸۷. پالایش خاک و آب آلوده به آفت‌کشها. چاپ اول انتشارات سازمان حفاظت محیط زیست، تهران.

4- Abdelhafid R., Houot S., and Barriuso E. 2000. Dependence of atrazine degradation on C and N availability in adapted and non-adapted soils. Journal of Soil Biology & Biochemistry 32: 389-401.

5- Álvaro A.M.G., Rui A.R., Al´ırio E. 2000. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. Biochemical Engineering Journal 6: 45–49.

6- 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.

7- Clausen G.B., Larsen L., Johnsen K., Lipthay R.J., and Aamand J. 2002. Quantification of the atrazine-degrading *Pseudomonas* sp. Strain ADP in aquifer sediment by quantitative competitive polymerase chain reaction. Journal of FEMS Microbiology Ecology 41: 221-229.

8- Cycon M., WÓjcik M., and Piotrowska Z. 2009. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. Journal of Chemosphere 76: 494–501.

9- Jennifer M. Andrews. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48 ، Suppl. S1, 5-16.

10- Jilani S., and Khan M.A. 2006. Biodegradation of Cypermethrin by *pseudomonas* in a batch activated sludge process. Journal of Int. J. Environ. Sci. Tech. 3 (4): 371-380.

11- Ghosh P.K., and Philip L. 2004. Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium. Journal of Water Research 38: 2277–2284.

12- Gonza´lez V.G., Govantes F., Shaw J.L., Burns G.R., and Santero1 E. 2003. Nitrogen Control of Atrazine Utilization in *Pseudomonas* sp. Strain ADP. Journal of Applied and Environmental Microbiology 69: 6987–6993.

13- Heipiepe H.J. 2007. Bioremediation of Soils Contaminated with Aromatic Compounds. Springer .

14- Herbicide factsheet, Atrazine: Toxicology. 2001. Journal of Pesticide Reform، 21: No. 2.

15- Hunter W.J., and Shaner D.L. 2009. Nitrogen limited biobarriers remove atrazine from contaminated water:

Laboratory studies. Journal of Contaminant Hydrology 103 :29–37.
16- Khan Sh.U. 1980. Pesticides in the soil environment. First edition. Elsevier Science Publisher B. V.
17- Kadian N., Gupta A., Satya S., Mehta R.K., and Malik A. 2008. Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed materials. Journal of Bioresource Technology 99: 4842–4847.
18- Kontchou C.Y., and Gschwind N. 1994. Mineralization of the Herbicide Atrazine as a Carbon Source by a Pseudomonas Strain. Journal of Applied and Environmental Microbiology 60. No. 12: 4297-4302.
19- 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.
20- Moreno J.L., Aliaga A., Navarro S., Herna´ndez T., and Garcı´a C. 2007. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. Journal of Applied Soil Ecology 35: 120–127.
21- Parag A.V., Kanekar P.P., Dhakephalkar P.K. 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.
22- Singh P., Suri C.R., and Cameotra S.S. 2004. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications 317: 697–702.
23- Rousseaux S., Hartmann A., and Soulas G. 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. Journal of FEMS Microbiology Ecology 36: 211-222.
24- Sene L., Converti A., Secchi G.A.R., and Simão R.C.G. 2010. New Aspects on Atrazine Biodegradation. Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology: Vol.53، n. 2: pp. 487-496.
25- Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. Journal of Pure Appl. Chem.، 73: No. 7, 1163–1172.
26- 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: 9284-9289.

Journal of Water and Soil
Vol. 25, No.4, Sep-Oct 2011, p. 799-806

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۰، ص.۸۰۶-۷۹۹

Study of Atrazine Biodegradation by *Pseudomonas fluorescence* and *Pseudomonas aeruginosa* (In Vitro)

D. Rezaei[1*]- Gh. Haghnia[2]- A. Lakzian[3]- M. Hassanzadeh Khayyat[4]- H. Nasirly[5]

Received:7-7-2010
Accepted:4-7-2011

Abstract

Atrazine biodegradation by bacteria is one of the most important aspects of bioremediation. Atrazine can be degraded by various species of bacteria. Bacteria use atrazine as nitrogen and carbon sources. The aim of this study was to determine atrazine degradation by *Pseudomonas fluorescence* and *Pseudomonas aeruginosa*. The experiment consisted of two *Pseudomonas* bacteria, three levels of atrazine concentrations (100, 200 and 300 $mg.l^{-1}$) and four types of MSM medium (complete, without nitrogen, without carbon and without nitrogen and carbon source). The results showed that both bacteria were able to degrad atrazine at all concentrations. However, increasing atrazine concentration led to more degradation of this herbicide. Biodegradation of atrazine by *Pseudomonas fluorescence* in concentrations of 100, 200 and 300 $mg.l^{-1}$ was 18.5, 48.91 and 72.6% respectively and it was 19.08, 33.83 and 62.66% respectively for *Pseudomonas aeruginosa* in a period of 48 hr. The most degradation of herbicide was observed by *Pseudomonas fluorescence* in MSM medium without N treatment. In this study nitrogen source was a limiting factor in degradation of atrazine by *Pseudomonas fluorescent*. Nitrogen source had no significant effect on degradation of atrazine by *Pseudomonas aeruginosa* in comparison with other MSM medium. In addition, the carbon source in both conditions (with and without) had no significant effect on atrazine degradation by both bacteria.

Keywords: Atrazine, Biodegradation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescence*

1,2,3- MSc Student, Professor and Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively
(*-Corresponding Author Email: danirezaie@yahoo.com)
4- Professor of Pharmaceutical Research Center and School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences
5- Expert of Analytical laboratory of Pharmaceutical Research Center, Mashhad University of Medical Sciences