

## Evaluation of diazinon pesticide biodegradation by isolated indigenous bacteria from contaminated soil

**Arezo Alipour**

M.Sc. Student of Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran,  
arezo.alipour71@gmail.com

**Ali Alizadeh**\*

Assistant professor of Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran,  
alializadeh2004@gmail.com

**Pejman Khodaygan**

Associate professor of Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran,  
pkhodaygan@vru.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** Pesticides have been developed as powerful tools that apply for population feeding needs, all over the world. Pesticides' overuse has become a serious issue about the environment. Among pesticides, diazinon is one of the organophosphorus insecticides that is used to control many different kinds of pests. There are a lot of researches about the toxicity effects of pesticides on the environment. However, one of the strategies to remove them from different environments is using degradation bacteria.

**Materials and methods:** For screening vernacular bacterium that are able to degrade the pesticide the sampling has been done from different soils of agriculture and industrial places, and the mineral salt medium was used for extvation of bacteria. After enrichment of samples in the mineral salt media, the isolation was done in the soild medium and 10 different sterains were based on morphology characters extracted and were identified to species level. The concentration of diazinon in the presence of bacteria was determined as a high performance liquid chromatography (HPLC).

**Results:** Among diazinon degradation isolates S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> reduced the concentration of diazinon from 50 mg.l to 3.18 mg.l and 5.21 mg.l after 15 days, respectively. The results indicated that S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> have higher efficiency to decreasing the amount of pesticide. Based on growing bacteria in the poor medium it's shown that bacteria used diazinon as an energy source. Results indicated that amplification and sequencing of 16S rDNA of S1 and S2 isolated have the highest similarity with *Paenibacillus* and *Pseudomonas*, respectively.

**Discussion and conclusion:** Results of this study revealed that degradation bacteria of diazinon exist in the places that used this insecticide and in the waste of industrial zone. It is expected that using these bacteria and biological resuscitation, it is possible to reduce some environmental hazardus issues of diazinon and also field application and determining the best formulation for bioramidation are essential in the future.

**Key words:** *Bacteria*, *Biodegradation*, *Diazinon*, *Pseudomonas*

---

\* Corresponding author

**Received:** January 8, 2017 / **Accepted:** August 8, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
شماره ۲۶، تابستان ۱۳۹۷، ۸۶-۷۳  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷

## ارزیابی تجزیه زیستی آفت کش دیازینون توسط باکتری‌های بومی جداشده از خاک‌های آلوده

**آرزو علی‌پور:** دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی گیاهی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران، arezo.alipoor71@gmail.com  
**علی علیزاده\*:** استادیار حشره‌شناسی گیاهی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران، alializadeh2004@gmail.com  
**پژمان خدایگان:** دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران، pkhodaygan@vru.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** آفت‌کش‌ها، ابزار قدرتمندی هستند که برای تأمین نیازهای غذایی جمعیت در حال رشد جهان، توسعه و کاربرد فراوانی یافته‌اند. مصرف بی‌رویه، این مواد را به تهدیدی جدی برای محیط‌زیست تبدیل کرده است. دیازینون یکی از آفت‌کش‌های فسفره آلی است که برای کنترل طیف وسیعی از آفت‌ها استفاده می‌شود. بررسی‌های بسیاری درباره آثار سمیت این آفت‌کش در محیط‌زیست انجام شده است. استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده یکی از راهکارهای حذف آفت‌کش‌ها از محیط‌های مختلف است.

**مواد و روش‌ها:** برای غربال‌گری باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده این آفت‌کش از خاک‌های مناطق مختلف صنعتی و کشاورزی نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌ها در محیط پایه معدنی انجام شد. پس از غنی‌سازی نمونه‌ها در محیط کشت پایه معدنی، ۱۰ جدایه متفاوت از نظر شکل ظاهری با کشت روی محیط کشت جامد جداسازی، خالص‌سازی و در حد جنس شناسایی شدند. میزان غلظت آفت‌کش دیازینون در حضور این جدایه‌ها در محیط کشت با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد تعیین شد.

**نتایج:** در پژوهش حاضر، جدایه‌های S1 و S2 از بین ۱۰ جدایه تجزیه‌کننده دیازینون، غلظت آفت‌کش دیازینون را از غلظت اولیه ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر طی ۱۵ روز پس از کشت به ترتیب به ۳/۱۸ و ۵/۲۱ میلی‌گرم بر لیتر رساندند؛ جدایه‌های یادشده نسبت به سایر جدایه‌ها بیشترین توان کاهش غلظت را داشتند. با توجه به رشد باکتری‌ها در محیط‌های کشت فقیر ارتباط می‌شود این جدایه‌ها از آفت‌کش دیازینون به عنوان منبع انرژی برای رشد خود استفاده می‌کنند. بر اساس نتایج تکثیر و تعیین توالی *16S rDNA*، جدایه‌های S1 و S2 به ترتیب بیشترین شباهت را به جنس‌های *Paenibacillus* و *Pseudomonas* داشتند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج پژوهش حاضر نشان دادند باکتری‌های تجزیه‌کننده آفت‌کش دیازینون در مناطق آلوده به این آفت‌کش و در فاضلاب‌های مناطق صنعتی وجود دارند. انتظار می‌رود با استفاده از این باکتری‌ها و روش‌های احیای زیستی، مشکلات زیست‌محیطی ناشی از آثار این آفت‌کش کاهش یابند و پس از بررسی در سطح میدانی و تعیین فرمولاسیون، از این جدایه‌ها برای پاکسازی زیستی استفاده شود.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری، تجزیه زیستی، دیازینون، سودوموناس

\* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## مقدمه

آفت‌کش‌ها، ابزار قدرتمندی هستند که برای تأمین نیازهای غذایی جمعیت در حال رشد جهان، توسعه و کاربرد فراوانی یافته‌اند. توسعه کشاورزی و تنوع آفت‌ها از مهم‌ترین عوامل مصرف روزافزون آفت‌کش‌ها در سراسر جهان به‌ویژه کشورهای در حال توسعه هستند. مصرف بی‌رویه، این مواد را به تهدیدی جدی برای محیط‌زیست تبدیل کرده است. این مواد در شمار مهم‌ترین آلاینده‌های آب‌های سطحی، زیرزمینی و همچنین خاک هستند (۱). حشره‌کش‌های آلی فسفره از مهم‌ترین آفت‌کش‌های دارای فسفر هستند؛ در این گروه، آفت‌کش‌هایی با ویژگی تماسی، گوارشی، نفوذی، تدخینی و سیستمیک وجود دارند. امروزه، این ترکیبات به دلایلی همچون ویژگی حشره‌کشی و کنه‌کشی شدید، اثرگذاری سریع، قابلیت متابولیسم سریع در بدن موجودات زنده، ویژگی نفوذی و سیستمیک برخی از آنها و همچنین تجزیه در خاک، آب و ایجاد آلودگی محیطی به‌طور گسترده به‌عنوان آفت‌کش و حشره‌کش استفاده می‌شوند (۲). از جمله آفت‌کش‌های فسفره آلی، دیازینون است که به‌طور گسترده در کشاورزی به کار برده می‌شود. ، از بین بردن پرندگان، آلودگی آب‌های سطحی و آثار مخرب روی گونه‌های آبی مدنظر از نگرانی‌های زیست‌محیطی اولیه درباره استفاده از دیازینون هستند. به دیازینون و متابولیت‌های آن در مطالعه‌های هشداردهنده درباره سیستم‌های آبی مختلف در سراسر جهان توجه شده است. دیازینون حلالیت محدودی در آب از ۶۸/۸ میلی‌گرم بر لیتر در ۲۰ درجه سلسیوس دارد؛ این مقدار نشان می‌دهد دیازینون به خاک محدود نمی‌شود و به‌طور متوسط تحرک زیادی در خاک دارد (۳). اگرچه

این آفت‌کش به‌ندرت از طریق پوست جذب می‌شود، به‌راحتی از راه شش‌ها جذب و در سرتاسر بدن بدون تجمع در بافت‌ها پخش می‌شود. از آنجا که دیازینون محلول در چربی است، چنانچه مقادیر چشمگیری از آفت‌کش در بافت چربی ذخیره شود، سمیت تأخیری ایجاد می‌کند. مالاتیون، فورات، بروموفوس و متیل‌پاراتیون از جمله حشره‌کش‌های فسفره (۴) و حشره‌کش‌های فسفره آلی، استرهای از نمک‌های آلی، فسفریک‌اسید و مشتق‌های آنها هستند. این حشره‌کش‌ها از مواد شیمیایی بسیار سمی برای انسان و حیوان محسوب می‌شوند و پایداری زیادی در محیط‌زیست دارند (۵). از متداول‌ترین روش‌های استفاده‌شده برای حذف دیازینون عبارتند از: جذب حرارتی، شستشوی خاک‌های آلوده، حذف‌زیستی، تصفیه در زمین، فرایندهای شیمیایی و فرایندهای اکسیداسیون مستقیم (۶). حذف‌زیستی، روشی کم‌هزینه و بدون آسیب به زیست‌شناسی خاک و بوم‌سازگار است. ریزموجودات نقش حیاتی در تخریب و تجزیه زیستی ترکیبات آلی دارند و از این آلاینده‌ها به‌عنوان منبع اصلی تغذیه خود استفاده و آنها را به مواد حل‌شدنی تبدیل می‌کنند؛ این فرایند با عنوان حذف‌زیستی شناخته شده است (۷). از اواخر دهه ۱۹۶۰ میلادی، به تجزیه میکروبی آفت‌کش‌ها و پاکسازی محیط‌های آلوده با باکتری‌ها توجه شده است. برخی باکتری‌ها مانند گونه‌های *Flavobacterium sp.* و *Sodomonas pseudomonas sp.*، ترکیبات فسفره آلی را با تولید آنزیم‌های فسفریک‌تری‌استرهدرولاز تخریب می‌کنند (۸). در روش حذف‌زیستی، امکان حذف یک یا چند آلاینده محیطی در بستر آلودگی با هزینه‌ای بسیار کمتر از روش‌های تصفیه فیزیکی و شیمیایی وجود دارد و

و داخل کیسه‌های پلاستیکی استریل ریخته شدند. در کیسه‌ها به خوبی بسته شد و تا زمان رسیدن به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

**ترکیبات شیمیایی استفاده شده:** آفت کش دیازینون لازم با درجه خلوص ۹۵ درصد از کارخانه تولید فرآورده‌های شیمیایی ایران با فرمولاسیون امولسیون ۶۰ درصد تهیه و استفاده شد. استاندارد آفت کش‌های دیازینون از شرکت سیگما آلدریج خریداری شد. حلال‌های استونیتریل با درجه خلوص ۹۹/۹۹ درصد، نمک‌های منیزیم سولفات و سدیم کلرید با درجه خلوص ۹۹/۵ درصد تهیه شدند. از گاز نیتروژن با خلوص ۹۹/۹۹ درصد برای تبخیر حلال نهایی استفاده شد.

**محیط کشت‌های استفاده شده:** محیط نوترینت آگار طبق دستورعمل از پودر تجاری NA به میزان ۲۰ گرم در لیتر تهیه شد.

محیط کینگز ب، طبق دستورعمل از پودر تجاری KB به میزان ۳۳/۵ گرم در لیتر و ۱۰ میلی لیتر گلیسرین تهیه شد.

محیط کشت پایه معدنی معدنی<sup>۱</sup> (MSM) تهیه محیط کشت پایه معدنی: ترکیب محیط کشت نمک معدنی (MSM)، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (۱ گرم)، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات (۱ گرم)، دی‌آمونیم سولفات (۱ گرم)، سولفات منیزیم (۰/۴ گرم)، کلرید آهن III (۰/۰۰۰۴ گرم)، کلرید کلسیم (۰/۰۲ گرم) در هر لیتر محیط و اسیدیته محیط ۷ است. پس از همگن کردن، محیط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شد. آفت کش دیازینون (تنها منبع کربن) با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر جداگانه تهیه و به محیط اضافه شد (۱۱)

محصول باقیمانده، اثر مخربی بر اکوسیستم محل آلوده ندارد (۹). در سال‌های اخیر، این رویکرد به دلایل ارزانی، سادگی، نداشتن تأثیر سو بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک در حال گسترش است. از آنجا که آفت کش دیازینون به‌طور وسیعی در بیشتر کشورها استفاده می‌شود، بر اثر استفاده مکرر باعث آلودگی محیط زیست از جمله منابع خاک می‌شود (۱۰). در پژوهش حاضر با نمونه برداری از مناطق مختلف آلوده به آفت کش‌ها و مناطق صنعتی دارای آلاینده‌های کربنی، چند جدایه از باکتری‌های بومی تجزیه کننده آفت کش دیازینون جداسازی شدند و غلظت دیازینون در حضور سوبیه‌های جداسازی شده با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد (HPLC) اندازه گیری شد. جدایه‌هایی که توانایی بیشترین کاهش غلظت آفت کش دیازینون در محیط کشت را داشتند، به‌عنوان قوی‌ترین جدایه‌ها در تجزیه آفت کش دیازینون انتخاب، شناسایی و بیشتر بررسی شدند.

## مواد روش‌ها

**نمونه برداری:** از زمین‌های کشاورزی آلوده به آفت کش دیازینون واقع در استان گلستان با مختصات  $36^{\circ} 44' 51''$  عرض شمالی و  $54^{\circ} 41' 42''$  طول شرقی و  $39$  کیلومتری جنوب غربی شهرستان گرگان و مناطق صنعتی از جمله پساب کارخانه فولاد در شهرستان زرنند و پساب مجتمع مس در شهرستان رفسنجان با مختصات  $29^{\circ} 56' 40''$  عرض شمالی و  $55^{\circ} 52' 20''$  طول شرقی و  $160$  کیلومتری جنوب غربی کرمان و  $50$  کیلومتری شهرستان رفسنجان نمونه برداری شد. با استفاده از دستکش، لایه رویی خاک (کاه و کلش) کنار زده شد و نمونه‌ها از عمق ۰ تا ۱۰ سانتی متری خاک جمع‌آوری

شد. سپس NaCl غلیظ (۲/۵ مولار) افزوده شد و محلول حاصل با دست تکان داده شد تا به خوبی مخلوط شود. پس از افزودن یک حجم کلروفرم و مخلوط کردن، ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی به آرامی به لوله فالکن جدید منتقل و یک حجم فنل - کلروفرم به آن اضافه شد. پس از مخلوط کردن، سانتریفیوژ تکرار و دوباره به لایه رویی کلروفرم افزوده شد. پس از سانتریفیوژ، فاز رویی به میکروتیوب منتقل و ۰/۱ حجم استات سدیم با غلظت ۳/۵ مولار به همراه یک حجم ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. نمونه‌ها یک شب در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. رسوب نوکلئیک‌اسید با ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه حاصل و پس از شستشو با الکل ۷۵ درصد و تبخیر کامل آن، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر میکروتیوب اضافه شد. نمونه‌های DNA ژنومی تهیه شده تا زمان کاربرد در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. نمایندگان جدایه‌ها که قدرت تجزیه‌کنندگی مناسبی داشتند، پس از تعیین واکنش گرم، اکسیداز، کاتالاز، رشد در شرایط بی‌هوازی و توانایی تولید رنگدانه فلورسنت در محیط کشت کینگز ب، برای شناسایی مقدماتی انتخاب شدند. بخشی از ناحیه *16s rDNA* از اپران ریبوزمی آنها به وسیله آغازگرهای عمومی تکثیر شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۰ پیکومول از آغازگرهای

63Forward: 5' AGCGGCGGACGGGTGA  
و GTA ATGCAGCAGCCGCG 3'  
1387Revwrs: 5'- AAGGAGGGGATCCAG  
CCGCAGGGTTG 3'

۰/۲ میلی‌مولار مخلوط dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)،  
۲ میلی‌مولار کلرورمینیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۲/۵  
میکرولیتر بافر ۱۰ برابر غلظت، ۰/۵ واحد Taq

### تهیه سوسپانسیون خاک و جداسازی باکتری‌های

تجزیه‌کننده آفت کش دیازینون: ابتدا محیط کشت پایه معدنی در آب مقطر ساخته و سپس اتوکلاو شد. پس از آن، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آفت کش دیازینون استریل شده (تنها منبع کربن) با فیلتر میلی‌پور به محیط اضافه شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. ۱۰ گرم از هر نمونه خاک در ارلن مایر ریخته و با محیط کشت آماده‌سازی شده به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۱۰ روز در گرمخانه دوار و دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلسیوس با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از گذشت ۱۰ روز، سری‌های رقت در آب مقطر استریل از نمونه تهیه شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌ها با میکروبیوت روی پلیت‌های حاوی محیط کشت کینگز ب کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، کلنی‌های رشد کرده روی هر یک از محیط کشت‌ها بررسی شدند.

### خالص‌سازی باکتری‌ها: کلنی‌های متمایز از نظر

رنگ یا شکل برای خالص‌سازی انتخاب شدند. جدایه‌ها در محیط لوریا برتانی حاوی ۵۰ درصد گلیسرول سوسپانسیون و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

### استخراج DNA برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها:

نوکلئیک‌اسید جدایه‌ها به روش معمول فنل - کلروفرم با اندکی تغییر استخراج شد. جدایه‌ها در محیط آگار مغذی کشت و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سوسپانسیونی از سلول‌های خالص باکتری ( $10^{12}$  cfu/ml) در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه و با افزودن سدیم دودوسیل سولفات ۱۰ درصد تحت حرارت پاره

polymerase و ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانوگرم DNA الگو در لوله های ۲۰۰ میکرولیتری تهیه شد (۱۲). شرایط زمانی و دمایی واکنش شامل مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، چسبیدن آغازگر به DNA ژنومی در دمای اتصال ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز در ژل آگارز به همراه نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas. SM0323) انجام شد. برای تهیه ژل آگارز، پودر آگارز با حرارت در بافر TBE(1X) حل و پس از بستن ژل در محفظه ژل استفاده شد. الکتروفورز محصول PCR ویژه روی ژل آگارز ۱ تا ۱/۵ درصد انجام شد. ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر محلول رنگ بارگذاری مخلوط و در چاهک ژل ریخته شد. الکتروفورز در اختلاف پتانسیل ثابت ۱۰۰ ولت انجام و با رسیدن رنگ به ۱ سانتی متری انتهای ژل پایان یافت. ژل ها با safe رنگ آمیزی و با دستگاه ژل داکیومننت مدل Kiagene مشاهده و عکس برداری شدند.

**بررسی میزان کارایی حذف دیازینون توسط سویه های شناسایی شده:** آماده سازی نمونه ها بر اساس روش اصلی کچرز<sup>۲</sup>، استخراج با استونیتریل و خالص سازی با گاز ازت انجام شد (۱۳). به این منظور، ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت پایه معدنی استریل با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر از آفت کش دیازینون تهیه و به ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شد. سپس، از هر باکتری مدنظر کشت شده روی محیط نوترینت آگار،

سوسپانسیونی در آب مقطر استریل تهیه و پس از آنکه جذب نوری سوسپانسیون یادشده در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۱ رسید، ۱ میلی لیتر از آن به هر ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایه زنی و به مدت ۱۰ روز داخل انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. برای آماده سازی نمونه، ۴ میلی لیتر از محیط داخل هر ارلن برداشته و داخل لوله فالکن ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و ۲ میلی لیتر حلال آلی استونیتریل به آن اضافه شد. سپس برای آب گیری طبق استاندارد کچرز، ۱/۶ گرم سولفات منیزیم بدون آب به هر لوله فالکن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و فاز آلی از فاز آبی جدا شد. سپس ۱ میلی لیتر از فاز رویی با استفاده از گاز ازت خشک و ۱ میلی لیتر استونیتریل به حجم رسید و به دستگاه HPLC تزریق شد. میزان تجزیه آفت کش دیازینون توسط جدایه های باکتریایی از طریق مقایسه زمان بازداری پیک های مشاهده شده در کروماتوگرام حاصل از نمونه با کروماتوگرام حاصل از تزریق محلول های استاندارد انجام شد. غلظت آفت کش نیز با استفاده از عدد سطح زیر پیک نمونه ها و قرار دادن آن در رابطه منحنی کالیبراسیون استاندارد آفت کش ها (رابطه ۱) محاسبه شد.

**ویژگی های دستگاه HPLC برای شناسایی و تعیین مقدار دیازینون:** فاز متحرک دستگاه آب و استونیتریل به نسبت ۲۰ به ۸۰، شدت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه، دمای ستون ۳۰ درجه سلسیوس و طول موج ۲۵۴ نانومتر بود. برای استفاده از دستگاه، ابتدا چند محلول با غلظت های معین دیازینون در استونیتریل تهیه و به دستگاه تزریق شدند تا زمان بازیابی دیازینون یافت و با داشتن غلظت های مشخص سطح زیر پیک منحنی استاندارد دیازینون مشخص شود. نمونه های حاصل از مرحله

$$LOD = \frac{(3S_{y/x})}{m} \quad \text{رابطه ۲}$$

در اینجا،  $S_{y/x}$  خطای برگشت  $x$  به  $y$  و  $m$  شیب منحنی کالیبراسیون است.

$S_{y/x}$  نیز از رابطه ۳ محاسبه شد:

$$S_{y/x} = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{x-2} \right]^{1/2} \quad \text{رابطه ۳}$$

در این رابطه  $y_i$  نقاط انفرادی خط کالیبراسیون،  $\bar{y}$  مقدار  $y$  منطبق‌شده روی خط کالیبراسیون و  $x$  تعداد نقاط منحنی کالیبراسیون است.

در این روش، برای اندازه‌گیری باقیمانده آفت کش و تجزیه آفت‌کشی که ریز موجودات در محیط کشت انجام می‌دهند، ۱۰۰ درصد باقیمانده موجود در محیط کشت به دلیل وجود ماتریس‌ها و ترکیبات مزاحم و همچنین وجود مقداری آب در محیط کشت استخراج نمی‌شود. از این رو، در روش‌های جدید برای استخراج آفت‌کش از محیط آبی توصیه می‌شود از روش کروماتوگرافی ستونی استفاده شود. پیش از انجام عملیات روی نمونه‌های اصلی، ابتدا باید آزمایش بازیابی (Recovery) انجام شود؛ به این شکل که مقداری از محیط کشت مدنظر با غلظت معین آفت‌کش، انتخاب و با اضافه کردن غلظت‌های مشخص آفت‌کش و انجام عمل استخراج و خالص‌سازی مطابق روش‌های یادشده به دستگاه تزریق و مقدار باقیمانده هر آفت‌کش اندازه‌گیری شد. با توجه به مقدار آفت‌کش اضافه‌شده و باقیمانده‌ای که دستگاه به دست می‌آورد، درصد بازیابی روش استخراج محاسبه شد. محاسبه درصد بازیابی برای هر آفت‌کش جداگانه و از طریق اضافه کردن مقادیر متفاوتی از غلظت هر آفت‌کش (بنا بر غلظت آن در نمونه) به محیط کشت آماده‌شده انجام شد (رابطه ۴)

استخراج با سرنگ به دستگاه تزریق شدند، نرم‌افزار دستگاه غلظت ماده مجهول را بر مبنای نسبت مساحت‌ها محاسبه کرد.

### تزریق و رسم خط کالیبراسیون: پیش از تزریق

نمونه‌ها، ابتدا باید خط کالیبراسیون مربوط به آفت‌کش رسم شود. منظور از این آزمایش، یافتن زمان دقیق بازداري و همچنین تهیه رابطه شیب خط برای محاسبه میزان غلظت آفت‌کش در نمونه‌هاست. به این منظور، ۲۰ میکرولیتر از استاندارد آفت‌کش دیازینون تهیه‌شده از شرکت سیگما آلدریج با غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر در حلال مناسب (استونیتریل) تهیه و به دستگاه تزریق شد، سپس منحنی کالیبراسیون مربوط به آنها رسم شد. شناسایی آفت‌کش موجود در نمونه‌ها از طریق مقایسه زمان بازداري پیک‌های مشاهده‌شده در کروماتوگرام حاصل از نمونه با کروماتوگرام حاصل از تزریق محلول‌های استاندارد انجام شد. غلظت آفت‌کش دیازینون نیز با استفاده از عدد سطح زیر پیک نمونه‌ها و قرارداد آن در (رابطه ۱) منحنی کالیبراسیون استاندارد آفت‌کش‌ها محاسبه شد:

$$Y = MC + I \quad \text{رابطه ۱}$$

در این رابطه  $Y$ ،  $M$ ،  $C$  و  $I$  به ترتیب پاسخ دستگاه، غلظت، شیب خط و عرض از مبدأ را نشان می‌دهند (۱۴)

### محاسبه حد تشخیص و درصد بازیابی آفت‌کش

**دیازینون:** برای مشخص شدن میزان تشخیص و درستی دستگاه، آزمایشی با عنوان محاسبه حد تشخیص و درصد بازیابی انجام شد. با تعیین درصد بازیابی نتیجه گرفته می‌شود روش خالص‌سازی تا چه حد صحیح انجام شده و حد تشخیص دستگاه مدنظر چند درصد از غلظت آفت‌کش موجود در نمونه را بروز داده است. حد تشخیص<sup>۳</sup> برای آفت‌کش دیازینون از رابطه ۲ محاسبه شد:

$$\text{درصد بازیابی} = \frac{\text{مقدار آفت کش اندازه گیری شده در نمونه آلوده}}{\text{مقدار آفت کش اندازه گیری شده در نمونه} + \text{مقدار آفت کش اضافه شده}} \times 100$$

رابطه ۴

میلی گرم بر لیتر آفت کش دیازینون و سپس کشت آنها روی محیط کشت جامد، ۱۰ کلنی مختلف از نظر شکل ظاهری در محیط های حاوی این آفت کش ها رشد کردند که با نام های  $S_1$  تا  $S_{10}$  کدگذاری شدند جدایه  $S_1$  دارای واکنش گرم، اکسیداز و کاتالاز مثبت و بی هوازی اختیاری بود و در بررسی تطابقی انجام شده با نرم افزار بلاست، ۹۹ درصد به جنس *Paenibacillus* شباهت داشت (شکل ۱). جدایه  $S_2$  باکتری گرم منفی با توان تولید رنگدانه فلورسنت روی سطح محیط کشت KB، واکنش گرم منفی و واکنش اکسیداز و کاتالاز مثبت بود؛ این باکتری در آزمون بررسی نیاز به اکسیژن، هوازی ارزیابی شد. نتیجه بررسی تشابه در ناحیه *16s rDNA* نشان داد این باکتری ۹۹ درصد به گونه *Pseudomonas stutzeri* شباهت دارد (شکل ۲).

**منحنی کالیبراسیون آفت کش دیازینون:** پس از تزریق محلول استاندارد ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ میلی گرم بر لیتر آفت کش دیازینون به دستگاه کروماتوگرافی مایع، منحنی کالیبراسیون آن رسم شد (شکل ۳).

**محاسبه حد تشخیص و درصد بازیابی آفت کش دیازینون:** برای تعیین میزان تشخیص و درستی دستگاه، آزمایش محاسبه حد تشخیص و درصد بازیابی انجام شد. نتایج تعیین درصد بازیابی نشان دادند روش خالص سازی تا درصد زیادی به درستی انجام شده و درصد بازیابی دیازینون برابر با ۱۰۲ درصد است. حد تشخیص دستگاه مدنظر نیز حد زیادی از غلظت آفت کش موجود در نمونه را جداسازی کرد و برابر با ۰/۰۰۴ میلی گرم بر کیلوگرم نشان داد.

**استفاده از الگوی سینتیکی برای بررسی روند کاهشی آفت کش ها و محاسبه  $DT_{50}$ :** پس از محاسبه غلظت نمونه ها در ۳، ۶، ۹ و ۱۵ روز پس از کشت، غلظت های حاصل از طریق الگوی سینتیکی مرتبه اول (First-order kinetics model) برازش شدند. نیمه عمر ( $DT_{50}$ ) در این الگو از رابطه های ۵ و ۶ محاسبه می شود:

$$[C]_t = [C]_1 e^{-kt} \quad \text{رابطه ۵}$$

$$DT_{50} = \text{Ln}(2) \times K^{-1} \quad \text{رابطه ۶}$$

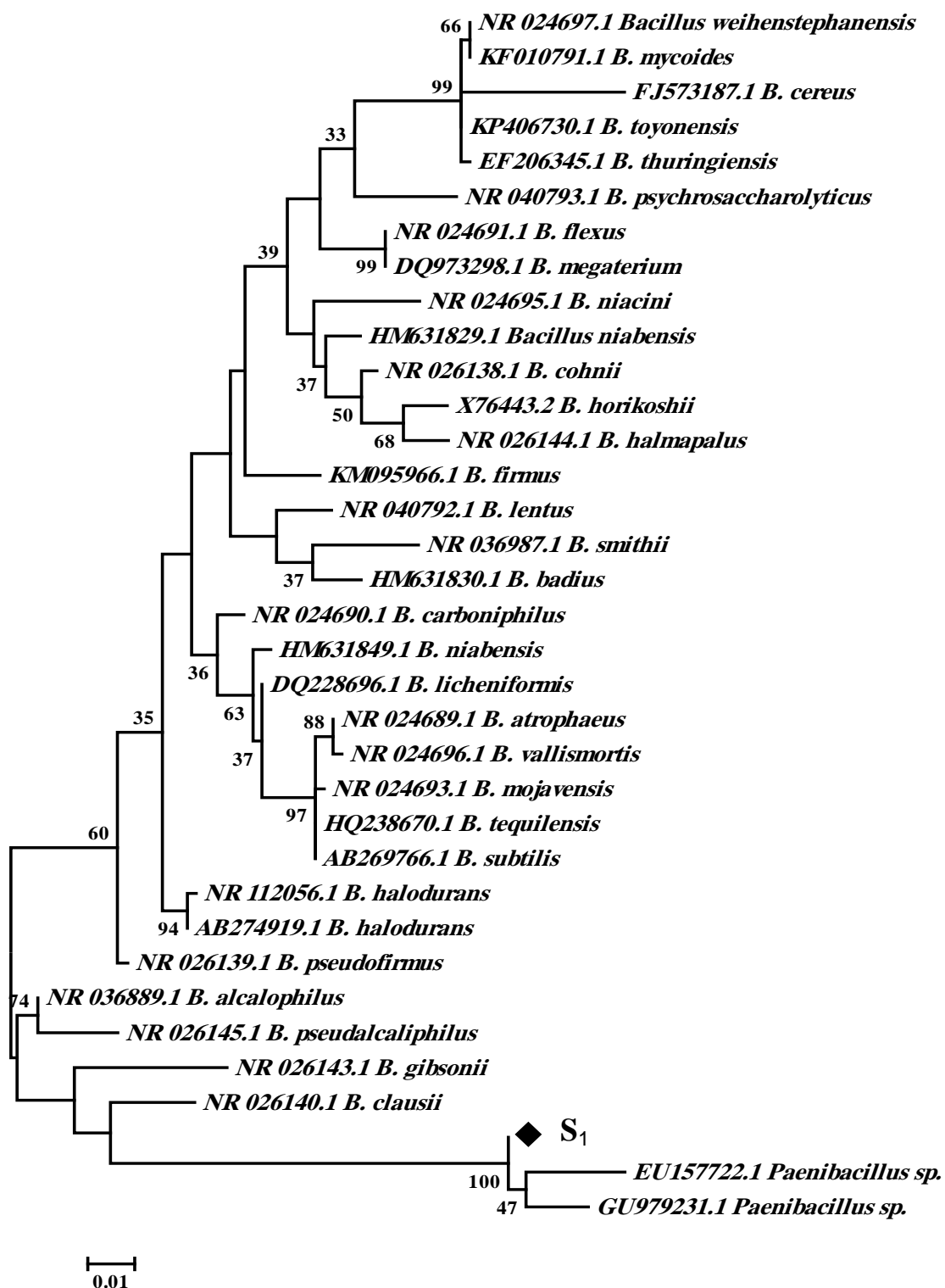
$[C]_t$  غلظت ترکیب (میلی گرم بر لیتر) در زمان  $t$ ،  $[C]_1$  غلظت اولیه ترکیب در زمان صفر که از طریق رابطه کینتیک مرحله اول تجزیه می شود،  $K$  ثابت سرعت تجزیه و  $t$  زمان بر حسب روز (۱۵)

**تجزیه و تحلیل داده ها:** برای تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل در پژوهش حاضر، از نرم افزار (SPSS21) استفاده شد. برای بررسی تأثیر سویه های باکتریایی بر کاهش غلظت آفت کش، آزمایش در سه تکرار و قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده ها با آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف در سطح اطمینان ۹۵ درصد برای بررسی توزیع و آزمون نرمال بودن داده ها استفاده شد. جدایه ها با توالی یابی ناحیه *16S rDNA* شناسایی شد.

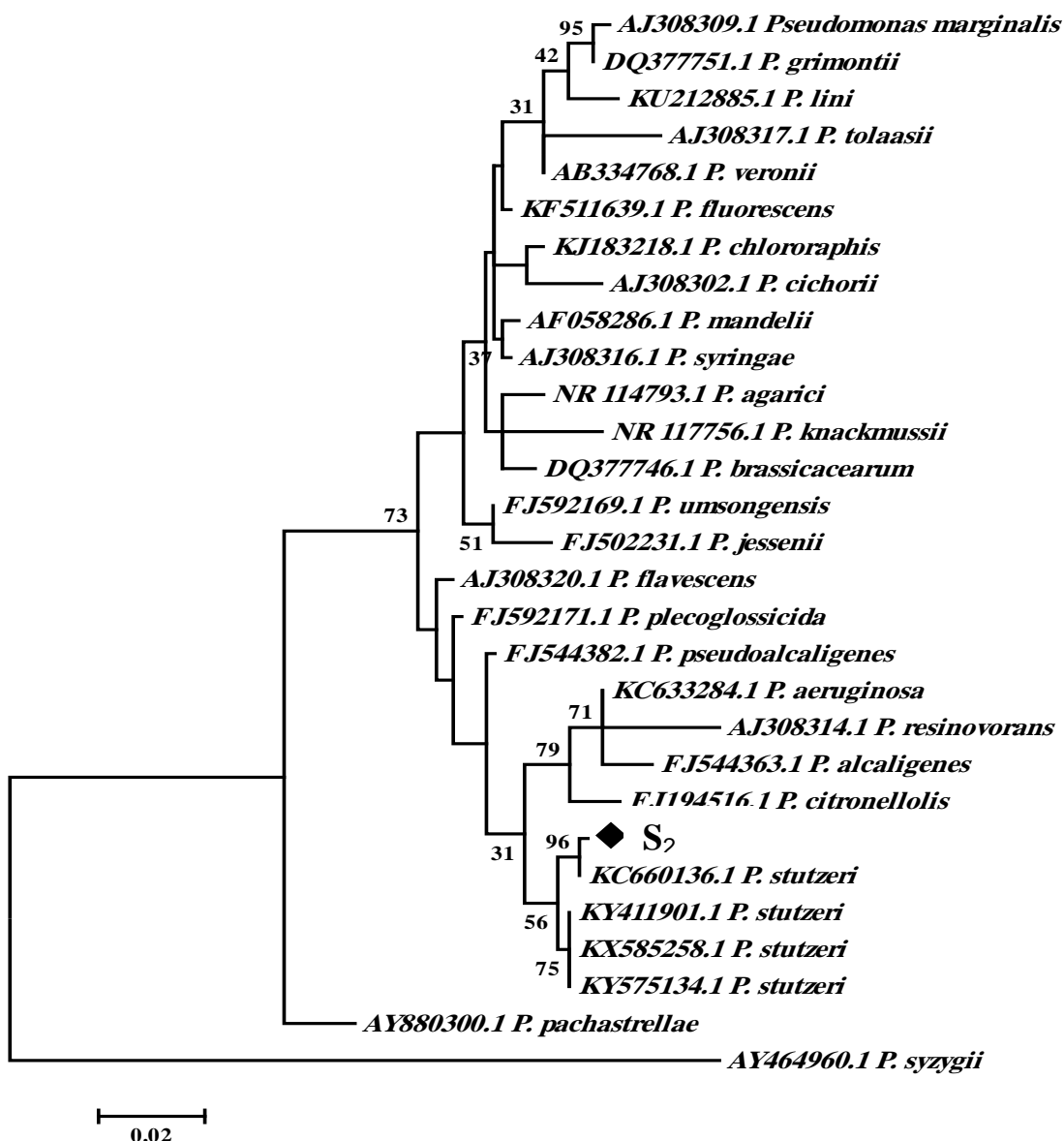
## نتایج

**جداسازی و خالص سازی باکتری های تجزیه کننده دیازینون:** پس از انتقال نمونه های خاک و رسوبات از مناطق مختلف کشاورزی و صنعتی به آزمایشگاه و تهیه سوسپانسیون در محیط کشت پایه معدنی حاوی ۵۰

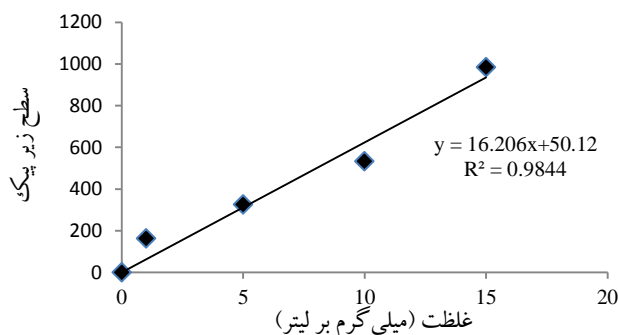




شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش ML، نشان‌دهنده ارتباط ژنتیکی توانمندترین جدایه ( $S_1$ ) تجزیه‌کننده آفت کش دیازینون در مقایسه با تعدادی از استرین‌های موجود در بانک ژن بر اساس تشابه توالی ناحیه *16s rDNA*

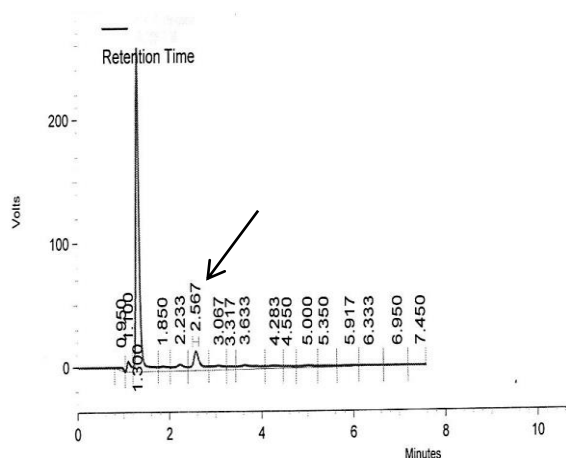


شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش ML، نشان دهنده ارتباط ژنتیکی توانمندترین جدایه (S<sub>7</sub>) تجزیه کننده آفت کش دیازینون در مقایسه با تعدادی از استرین های موجود در بانک ژن بر اساس تشابه توالی ناحیه 16s rDNA

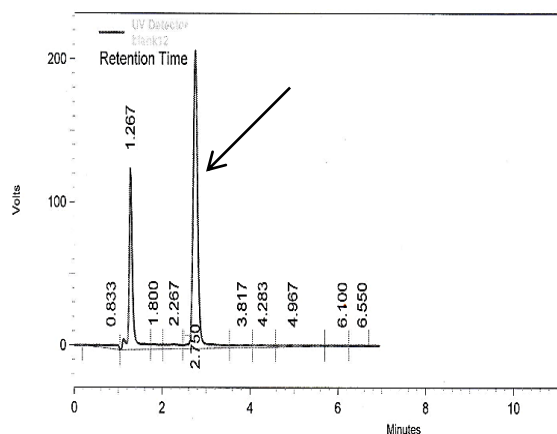


شکل ۳- منحنی کالیبراسیون آفت کش دیازینون

پارامترهای برآورده شده در این الگو معنادار هستند. جدول ۱، شاخص‌های نیمه‌عمر حشره‌کش دیازینون در حضور جدایه‌های  $S_1$  و  $S_2$  و مقایسه آن با شاهد را نشان می‌دهد. بر اساس این، نیمه‌عمر دیازینون در حضور جدایه  $S_1$  و  $S_2$  به ترتیب برابر  $3/79$  و  $3/87$  روز محاسبه شد، در حالی که نیمه‌عمر آفت‌کش دیازینون در نمونه شاهد برابر  $8/9$  روز است.



شکل ۴- کروماتوگرام مربوط به استاندارد آفت‌کش دیازینون (علامت پیکان مربوط به پیک دیازینون است)

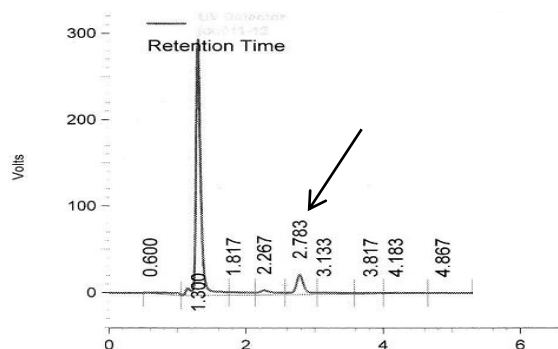


شکل ۵- نمودار دیازینون شاهد (میزان تجزیه آفت‌کش دیازینون با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بدون حضور باکتری است که تمام مراحل استخراج روی آن انجام شده است) و علامت پیکان به پیک دیازینون مربوط است.

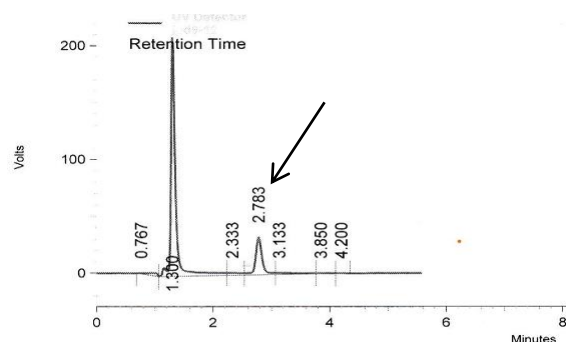
**بررسی میزان مصرف و کاهش دیازینون توسط جدایه‌ها:** مقدار باقیمانده آفت‌کش دیازینون در محیط کشت MSM که جدایه‌های  $S_1$  و  $S_2$  در آن به طور جداگانه کشت داده شده بودند، در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ پس از کشت از طریق آماده‌سازی هر نمونه با روش کچرز و تزریق به دستگاه محاسبه شد. غلظت‌های محاسبه شده با غلظت نمونه‌های شاهد مقایسه شدند که در آنها هیچ جدایه باکتری تلقیح نشده بود. غلظت آفت‌کش در هر نمونه با توجه به سطح زیر پیک مشخص شد، به طوری که پیش از تزریق نمونه‌ها، استاندارد آفت‌کش دیازینون به دستگاه تزریق و زمان بازداری آن محاسبه شد. منحنی کالیبراسیون بر اساس زمان بازداری و سطح زیر پیک استاندارد در غلظت‌های متفاوت رسم و غلظت آفت‌کش بر اساس رابطه خط حاصل محاسبه شد. زمان بازداری برای آفت‌کش دیازینون در زمان  $2/567$  دقیقه بود (شکل ۴). شکل ۵، کروماتوگرام نمونه شاهد و میزان تجزیه آفت‌کش با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بدون حضور باکتری است که تمام مراحل استخراج روی آن انجام شده است؛ غلظت آفت‌کش ۱۵ روز پس از تلقیح به  $15/59$  میلی‌گرم بر لیتر رسید، در حالی که غلظت آفت‌کش در حضور جدایه‌های  $S_1$  (شکل ۶) و  $S_2$  (شکل ۷) به ترتیب به  $3/18$  و  $5/21$  میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت. این نشان می‌دهد کاهش غلظت آفت‌کش در نمونه‌ها در اثر فعالیت باکتری و استفاده آفت‌کش موجود در محیط به عنوان منبع کربن و فسفر توسط جدایه‌هاست. همچنین نتایج مربوط به برآزش الگوی سینتیکی (رابطه‌های ۵ و ۶) مقادیر باقیمانده دیازینون در حضور جدایه‌های تجزیه‌کننده  $S_1$  و  $S_2$  و

### بحث و نتیجه گیری

تاکنون پژوهشگران، باکتری های تجزیه کننده آفت کش های کشاورزی را در محیط های مختلف و اکوسیستم های خاکی و آبی متفاوت بررسی کرده اند. همچنین، پژوهشگران بسیاری باکتری های بومی جدا شده از خاک های آلوده به آفت کش های فسفره مانند دیازینون را بررسی کرده اند<sup>۴</sup> از جمله تام<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند تعداد باکتری های تجزیه کننده آفت کش دیازینون در خاک های آلوده هند بسیار زیاد است و توان در خور توجهی برای تجزیه آفت کش دیازینون دارند و این تعداد، با اضافه شدن دیازینون به خاک افزایش می یابد (۱۶). در پژوهش های دیگر، باکتری های متنوعی به عنوان باکتری های توانا در تجزیه آفت کش دیازینون و سایر ترکیبات جداسازی شدند که برخی از آنها مشابه باکتری های جدا شده در پژوهش حاضر هستند؛ از جمله تیان<sup>۵</sup> و همکاران (۲۰۰۸) باکتری های تجزیه کننده آفت کش دیازینون از جنس های *سودوموناس* و *باسیلوس* را از مناطق آلوده در مصر جداسازی کردند. در کل، باکتری های *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس آئروژینوزا* توانایی زیادی در تجزیه آفت کش های فسفره از جمله دیازینون و برخی ترکیبات نفتی دارند. باکتری های متعلق به جنس های مختلف، آفت کش ها را تجزیه می کنند. در سراسر جهان، افزایش آگاهی از ماندگاری و سمیت آفت کش های فسفره آلی و آثار جبران ناپذیر آنها بر انسان و اکوسیستم های مختلف زمین سبب توجه بیشتر به تجزیه میکروبی این آفت کش ها شده است (۱۷). در سال ۱۹۷۳، روزنبرگ و الکساندر<sup>۶</sup> شکاف میکروبی را عامل اصلی تجزیه حشره کش های فسفره آلی دانستند (۱۸). در سال ۲۰۰۴، کانکار<sup>۷</sup> با بررسی گسترده تجزیه



شکل ۶- نمودار تجزیه دیازینون توسط باکتری  $S_1$  (میزان تجزیه آفت کش دیازینون با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر با حضور باکتری  $S_1$  است که تمام مراحل استخراج روی آن انجام شده است) و علامت پیکان به پیک دیازینون مربوط است.



شکل ۷- نمودار تجزیه دیازینون توسط باکتری  $S_2$  (میزان تجزیه آفت کش دیازینون با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر با حضور باکتری  $S_2$  است که تمام مراحل استخراج روی آن انجام شده است) و علامت پیکان به پیک دیازینون مربوط است.

جدول ۱- شاخص های نیمه عمر حشره کش دیازینون در حضور جدا به های  $S_1$  و  $S_2$  و مقایسه آن با شاهد

زمان (روز)	شاهد	$S_1$	$S_2$
۰	۵۰	۵۰	۵۰
۳	۴۸/۲۷	۴۴/۱۱	۲۵/۵۴
۶	۴۳/۵۴	۳۵/۱۰	۳۶/۰۵
۹	۳۴/۵۳	۱۵/۲۷	۱۵/۲۳
۱۲	۲۴/۳۵	۹/۲۰	۱۰/۲۱
۱۵	۱۵/۵۹	۳/۱۸	۵/۲۱
K	۰/۰۷۷۳	۰/۱۸۳۹	۰/۱۷۹
$DT_{50}$	۸/۹	۳/۷۹	۳/۸۷
$P < .05$	....	۰/۰۳	۰/۰۴۸

میکروبی ۱۰ نمونه خاک در هند، ۲۲ سویه باکتری متعلق به جنس‌های *Bacillus*, *Planococcus*, *Stomatococcus* و *Pseudomonas*, *Arthrobacter* از خاک‌هایی جداسازی کرد که مدت زیادی در معرض حشره‌کش‌های فسفره آلی بودند (۱۹). در سال ۲۰۰۹، کیکن<sup>۱</sup> و همکاران با بررسی خاک‌های کشاورزی هند که مدت زیادی در معرض آفت‌کش‌های فسفره آلی از جمله دیازینون بودند، باکتری‌های تجزیه‌کننده‌ای را از جنس‌های مختلف *Pseudomonas* sp. و *Flavobacterium* sp. شناسایی کردند (۱۱). پژوهشگران مختلف بارها توانایی این گونه‌ها در تجزیه زیستی آلاینده‌ها را گزارش کرده‌اند و بسیاری از مطالعه‌های پیشین به جداسازی این گونه‌ها از محیط‌های آبی و خاکی منجر شده‌اند. در تمام این مطالعه‌ها، توانایی گونه‌های باکتریایی در استفاده از آلاینده‌های آلی و همچنین هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی تأیید شده است و امروزه در مهندسی ژنتیک استفاده می‌شوند؛ به‌ویژه جنس *سودوموناس*‌ها که به‌زیررده گاما از پروتوباکترها تعلق و نقش بسیار مهمی در فعالیت متابولیکی محیط زیست مانند چرخه عناصر و تجزیه آلاینده‌های ناشی از فعالیت‌های زیستی و غیر زیستی دارند. به توانایی *سودوموناس*‌ها در فعالیت‌های زیست‌فناوری به‌ویژه در زمینه تجزیه زیستی نیز بسیار توجه شده است (۲۰). مشخص شده است باکتری‌های جنس *سودوموناس*، توانایی بسیار زیادی در استفاده از ترکیبات سمی، آلاینده‌های آلی و همچنین ترکیبات نفتی و آروماتیک دارند و از این رو، این باکتری‌ها بارها از انواع اکوسیستم‌های آلوده به ترکیبات مختلف جدا شده‌اند و علاوه بر، تجزیه آفت‌کش‌ها، توانایی تجزیه

ترکیبات پلی‌آروماتیک حلقوی از جمله نفتالن و سایر ترکیبات نفتی را دارند (۲۱). این باکتری‌ها، مواد آلی را در حضور اکسیژن (پذیرنده الکترونی) و از راه‌های بیوشیمیایی تجزیه هوازی تجزیه می‌کنند. چرخه تنفسی باکتری‌های تجزیه‌کننده از جمله *سودوموناس*‌ها شامل سیتوکروم‌های مختلف و انواع گوناگون اکسیدازهای انتقالی متصل به اکسیژن است. جنس *سودوموناس* از معمول‌ترین باکتری‌هایی است که در بیشتر گزارش‌های مربوط به تجزیه زیستی وجود دارد (۲۲). گونه‌های بسیاری در تجزیه ترکیبات فسفره و سایر آفت‌کش‌ها جداسازی شده‌اند ولی گونه‌های *باسیلوس* و *سودوموناس*، توانمندترین گونه‌های شاخص شناخته شده‌اند و حضور آنها در بیشتر شرایط محیطی، عامل مهمی است که استفاده از آنها را در بیشتر محیط‌ها ممکن می‌کند (۲۳). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند در فلور باکتریایی خاک‌های آلوده به آفت‌کش دیازینون، باکتری‌هایی با قابلیت سازگار شدن با دیازینون وجود دارند؛ به این معنا که آلودگی با ترکیبات سمی آفت‌کش‌ها مانع رشد باکتری‌های خاک در محیط‌های آلوده نیست. همچنین نتایج سنجش باقیمانده آفت‌کش دیازینون با کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های خاک، توانایی استفاده از این آفت‌کش‌ها را به‌عنوان منبع کربن در شرایط آزمایشگاهی دارند. این باکتری‌ها از آفت‌کش موجود در محیط کشت‌های فقیر برای رشد خود استفاده می‌کنند و سبب کاهش غلظت آفت‌کش در محیط کشت می‌شوند. داده‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهند باکتری‌های موجود در خاک آلوده که جداسازی و کشت شده‌اند، دیازینون را تجزیه و از آفت‌کش دیازینون به‌عنوان منبع غذایی استفاده می‌کنند.

- (4) Yang Y., Yang J., Zhao J., Song Y., Gao L., Yang R., et al. Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. *Journal of Basic and Applied Sciences* 2015; 79: 502-510.
- (5) Massoud M., Abdel-Megeed A., Saad A., Khalil DH. Bacterial Strains from the Rhizosphere for Remediation of Certain Pesticides. *Advanced Materials Research* 2011; 70: 1143-1150.
- (6) Zeinat Kamal M., Nashwa A., Mohamed AI., Sherif EN. Biodegradation and detoxification of malathion by of *Bacillus thuringiensis* MOS-5. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2008; 2: 724-732.
- (7) Liu ZY., Chen X., Shi Y., Su ZC. Bacterial degradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. *Advanced Materials Research* 2012. 37; 676-680.
- (8) Ewida AY. Biodegradation of alachlor and Endosulfan Using environmental bacterial strains. *World Applied Sciences Journal* 2014; 32: 540-547.
- (9) Agamuthu P., Tan YS., Fauziah SH. Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil Using Selected Organic Wastes. *Procedia Environmental Sciences* 2013; 18: 694-702.
- (10) Jabeen H., Iqbal S., Anwar S. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a novel rhizobial strain *Mesorhizobium* sp. HN<sub>3</sub>. *Water and Environment Journal* 2014; 15: 300-306
- (11) Cycon M., Wojcik M., Piotrowska-Seget, Z. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Journal of Chemosphere* 2009; 76: 494-501.
- (12) Marchesi JR., Sato T., Weightman AJ., Martin TA., Fry JC., Hiom SJ., et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64(2): 795-799.
- (13) Anastassiades M. Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS (MS) following acetonitrile extraction/ partitioning and cleanup by dispersive SPE- QUChERS method. *Journal of Agricultural and food chemistry* 2007; 48: 2987-2995.

با توجه به سمیت زیاد آفت کش‌های فسفره و حضور غلظت‌های بحرانی آنها در خاک و آب‌های زیرزمینی، ریزموجودات موجود در رسوبات و خاک‌ها به علت سازگارشدن، توانایی زیادی در تجزیه این ترکیبات دارند. باکتری‌های موجود در مناطق آلوده که در پژوهش حاضر جداسازی و کشت شدند، آفت کش فسفره دیازینون را تجزیه می‌کنند. باکتری‌های یاد شده این آفت کش را به‌عنوان منبع غذایی کربن و فسفر استفاده می‌کنند و باعث تجزیه و کاهش غلظت این ترکیب می‌شوند. نتایج HPLC در پژوهش حاضر نیز قدرت زیاد باکتری‌های جدا شده را در تجزیه این آفت کش‌ها نشان دادند. از این رو، این باکتری‌ها باکتری‌های بومی منطقه در نظر گرفته می‌شوند و با توجه به اینکه حذف زیستی آلاینده‌ها رویکردی برای حفظ محیط زیست است، پیشنهاد می‌شود از ریزموجودات جدا شده که توانایی خوبی در تجزیه این آفت کش نشان داده‌اند به شرط آزمایش در شرایط خاک و آب، برای کاربرد نهایی رفع آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از این آفت کش استفاده شود.

## References

- (1) Singh BK., Walker A., Morgan JAW., Wright, DJ. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70: 4855-4863.
- (2) Casida JE., Quistad GB., Organophosphate Toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Research Toxicology* 2004; 17(8): 983-988.
- (3) Hward PH. *Hand Book of Enviromental Fate and Exposare Data for organic chemicals pesticides*. Environ Micbiology; 1989; 14: 926-930.

- (14) Chakrabraty AM., Chou G., Gumsalus IC. Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Applied Enviromental Microbiology* 1973; 62: 1137-1140.
- (15) Focus S. Guidance document on estimating persistence and degradation kinetics from environmental fate studies on pesticides in EU registration. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 2006; 48: 3095-3097.
- (16) Tam NF., Guo CL., Yau C., Wong Y.S. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial cocsortia enriched from mangrove sediments. *Journal of Water Scince Technology* 2003; 48(8): 177-183.
- (17) Tian Y., Liu HJ., Zheng TL., Kwon K.K., Kim SJ. The biochemistry and uses of pesticides. *Journal of Biotechnology* 2008; 8(22): 6301-6303.
- (18) Rosenberg A., Alexander M. Microbial cleavage of various organophosphorus insecticides. *Applied and Environmental Microbiology* 1979; 37: 886-891.
- (19) Kanekar P., Bhadbhade B., Deshpande M. Biodegreadtion of Organophosphorus pseticides, *International conference on Harmonisation (ICH)* 2004; 12: 400-403.
- (20) Nelson KE., Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Einvironmental Microbiology* 2002; 4(12): 799-808.
- (21) Nnamchi CI., Obeta JNA., Ezeogu LI. Isolation and characterization of some poly aromatic hydrocarbon degrading from Nsukka soils in Nigeria. *International Journal of Environmental* 2006; 3(2): 181-190.
- (22) Minoui S. Effect of heavy crude oil on the pattern of respiratory chain of *Pseudomonas* sp. *International Journal of Environmental* 2008; 47: 760-765.
- (23) Okoh AI. Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria. *International Journal of Environmental Research Public Health* 2003; 6: 278-309.

---

<sup>1</sup>- Mineral Salt Medium

<sup>2</sup>- QUEChERS

<sup>3</sup>- Limit of detection

<sup>4</sup>- Tam

<sup>5</sup>- Tiyan

<sup>6</sup>- Rosenberg and Alexander

<sup>7</sup>- Kanekar

<sup>8</sup>- Cycon