Isolation and Identification of Othello, Atlantis, and Puma Super Herbicide-resistant Bacteria Isolated from the Soil of Wheat Farms

Abdolreza Ahmadi
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran, ahmadi.a@lu.ac.ir
Hossein Mirzaei Najafgholi
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran, mirzaeih89@gmail.com
Milad Aeini *
Department of Plant Protection, Faulty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, m.aeini@scu.ac.ir
Kazem Kakulvand
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran, kazem@yahoo.com

Abstract

Introduction: One of the new methods in reducing the pollution caused by the use of herbicides and other agricultural chemical pesticides is the use of resistant and degrading bacterial isolates of these herbicides. This study was conducted to isolate and identify resistant bacterial strains from the soil of wheat fields using the three herbicides of Othello, Atlantis, and Puma Super.

Materials and methods: To isolate and characterize resistant bacteria, samples were collected from wheat fields treated with Othello, Atlantis, and Puma Super herbicides. Isolates were selected based on the growth on the Standard Succinate Medium containing 10 percent of the mentioned herbicides. The representative isolates were identified based on biochemical tests and amplification of the 16S rRNA gene. Also, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the representatives were measured.

Results: A total of 17 isolates could grow on a growth medium containing 10% of the tested herbicides. Based on the valid biochemical and molecular test results, the representative strains were identified as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ensifer adhaerens*, *Xanthomonas* sp., *Pseudoxanthomonas* sp., and *Acinetobacter* sp. The Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were attributed to Othello (0.28 and 0.4) and Atlantis herbicides (0.35 and 0.5) belonging to *Acinetobacter* and *Xanthomonas* (0.45 and 0.67) for Puma Super herbicides.

Discussion and conclusion: According to the results of this study, herbicide-resistant bacteria identified in this study can be useful in plant biotechnology applications in polluted areas and can reduce environmental pollution regarding using these herbicides. However, further studies are needed in order to identify the degrading potential of the resistant strains.

Key words: Inoculation, Bioremediation, Weed

* Corresponding author
Received: April 29, 2020 / **Accepted:** June 23, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال دهم، شماره ۳۷، بهار ۱۴۰۰ ، ص، ۶۷ - ۷۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۳
doi: 10.22108/BJM.2020.122745.1296

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر از خاک مزارع گندم

عبدالرضا احمدی: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، ahmadi.a@lu.ac.ir
حسین میرزایی نجفقلی: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، mirzaeih89@gmail.com
میلاد آئینی *: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاوزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، m.aeini@scu.ac.ir
کاظم کاکولوند: گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، kazem@yahoo.com

چکیده

مقدمه: یکی از روش‌های نوین برای کاهش آلودگی‌های ناشی از کاربرد علف‌کش‌ها و سایر سموم شیمیایی کشاورزی، استفاده از جدایه‌های باکتریایی متحمل و تجزیه‌کنندهٔ این علف‌کش‌هاست. پژوهش حاضر به‌منظور جداسازی و شناسایی جدایه‌های باکتریایی مقاوم یا متحمل در برابر علف‌کش‌های اُتللو، آتلانتیس و پوماسوپر از خاک مزارع گندم انجام شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از خاک مزارع گندم تیمارشده با سه علف‌کش اُتللو، آتلانتیس و پوماسوپر انجام شد. جدایه‌های باکتریایی با استفاده از محیط‌کشت سوکسینات استاندارد حاوی ۱۰ درصد از علف‌کش‌های آزمایش‌شده جداسازی شدند. جدایه‌های نماینده بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و تکثیر ژن *16S rRNA* شناسایی شدند. کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت کشندگی برای هر سه علف‌کش آزمایش‌شده محاسبه شد.

نتایج: درمجموع، تعداد ۱۷ جدایه توانایی رشد روی محیط‌های رشد حاوی ۱۰ درصد از علف‌کش‌های آزمایش‌شده را داشتند. بر اساس کلیدهای باکتری‌شناسی معتبر و نتایج آزمون‌های مولکولی روی جدایه‌های نماینده، *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، *انسیفر ادهائرنس*، *زانتوموناس*، *سودوزانتوموناس* و *اسینتوباکتر* شناسایی شدند. کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت کشندگی در علف‌کش‌های اُتللو (به‌ترتیب ۰/۲۸ و ۰/۴) و آتلانتیس (به‌ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۵) برای *اسینتوباکتر* و در علف‌کش پوماسوپر برای جنس *زانتوموناس* (به‌ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۶۷) محاسبه شد.

بحث و نتیجه‌گیری: باتوجه‌به نتایج پژوهش حاضر، شناسایی جدایه‌های متحمل و تعیین میزان تحمل آنها به علف‌کش‌های یادشده، گامی مهم در پژوهش‌های زیست‌فناوری آینده به‌منظور پالایش آلاینده‌ها از محیط‌های آلوده است و می‌تواند مشکلات زیست‌محیطی ناشی از این علف‌کش‌ها در اکوسیستم را کاهش دهد؛ ازاین‌رو، پژوهش‌های بیشتر برای تعیین توانایی جدایه‌های باکتریایی مقاوم در تجزیه‌کنندگی علف‌کش‌های یادشده پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تلقیح، زیست‌پالایی، علف هرز

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2021, 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

رشد روزافزون جمعیت انسانی در جهان، مسئلهٔ نیاز غذایی و تأمین امنیت غذایی بشر را به چالشی بحث‌برانگیز تبدیل کرده است. باوجود تلاش برای افزایش تولید، به‌طور معمول عوامل خسارت‌زای زنده و غیرزنده مانند علف‌های هرز بر محصولات کشاورزی تأثیر می‌گذارند. سطح زیرکشت گندم در کشورهای درحال توسعه برابر ۱۲۵ میلیون هکتار و در کشورهای توسعه‌یافته برابر ۹۵ میلیون هکتار است که درمجموع، ۲۲۰ میلیون هکتار (معادل ۷۵ درصد) از سطح کشت دنیا را به خود اختصاص می‌دهد. در ایالات متحدهٔ آمریکا، علف‌های هرز به‌تنهایی سبب کاهش ۱۲ درصد از عملکرد گندم می‌شوند؛ میانگین کاهش عملکرد ناشی از رقابت این گیاهان در مزارع گندم ایران حدود ۲۳ درصد گزارش شده است (۱).

امروزه، علف‌کش‌ها به یکی از مهم‌ترین و ضروری‌ترین نهاده‌ها در سیستم‌های کشت تبدیل شده‌اند و بخش درخور توجهی از عملکرد محصولات زراعی ازجمله گندم مرهون استفاده از علف‌کش‌هاست (۲ و ۳). از دیدگاه مدیریت شیمیایی علف‌های هرز، علف‌کش‌ها در یک فصل زراعی بسیار مفید هستند، اما فعالیت زیادی دارند و می‌توانند پایداری خود را در خاک حفظ کنند و سبب آسیب به گیاهان زراعی حساس در تناوب‌های زراعی و همچنین آلودگی‌های محیط‌زیست شوند (۴). در سال‌های اخیر، روش‌های نوینی برای مقابله با خطر باقیماندهٔ علف‌کش‌ها به کار گرفته شده‌اند (۵) و یکی از سازوکارهایی که به‌تازگی توجه دنیا را جلب کرده است، به‌کارگیری باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ علف‌کش‌هاست. باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و جلبک‌ها، ریزموجودات اصلی تشکیل‌دهندهٔ خاک هستند که در بین آنها، باکتری‌ها پتانسیل لازم برای تجزیهٔ زیستی و متابولیسم میکروبی سموم را دارند (۴). زیست‌پالایی[1] یا حذف زیستی آلاینده‌ها یکی از روش‌های کارآمد و مطمئن نسبت به سایر فناوری‌های پاک‌سازی است (۶). پژوهش‌های دانشمندان نشان داده‌اند در تجزیهٔ سریع علف‌کش‌های تیوکاربامات در خاک‌های آلوده به علف‌کش، تراکم ریزموجودات تجزیه‌کننده پس‌از تجزیهٔ علف‌کش نیز همچنان زیاد است (۷). در مطالعه‌ای که رضایی[2] و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام دادند، شیوهٔ عمل دو باکتری *سودوموناس فلورسنس*[3] و *سودوموناس آرژینوزا*[4] در تجزیهٔ آترازین در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بررسی دقیق‌تر نشان داد دو گونهٔ *سودوموناس فلورسنس* و *سودوموناس آرژینوزا* نتایج متفاوتی از تجزیهٔ علف‌کش را در سه سطح غلظتی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر و سه نوع محیط‌کشت نمک‌های معدنی کامل، بدون کربن و بدون نیتروژن نشان می‌دهند. نتایج بررسی یادشده نشان دادند هر دو باکتری توان تجزیهٔ علف‌کش آترازین را در هر سه غلظت استفاده‌شده طی بازهٔ زمانی دو روز دارند. بررسی بیشتر نشان داد با افزایش غلظت تا ۳۰۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر، دو باکتری *سودوموناس فلورسنس* و *سودوموناس آرژینوزا* می‌توانند علف‌کش آترازین بیشتری را تجزیه کنند که رابطهٔ مستقیم بین آنها را نشان می‌دهد (۸). بهکی[5] و خان[6] در سال ۱۹۸۶ گزارش کردند برخی از گونه‌های جنس باکتریایی *سودوموناس*[7] توانایی رشد در محیط‌کشت حاوی علف‌کش آترازین را از طریق فرایند اکسایش زنجیره‌های آلکیل طی مدت ۳۰ روز دارند (۹). مندلبیوم[8] و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند گونه‌های خاصی از باکتری *سودوموناس* که

با عنوان نژاد ADP شناخته می‌شوند، توانایی تجزیهٔ علف‌کش آترازین را دارند (۱۰). علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر ازجمله علف‌کش‌های سیستمیک هستند که برای کنترل علف‌های هرز پهن‌برگ و باریک‌برگ در مزارع گندم استفاده می‌شوند (۱۱). ازآنجاکه تاکنون پژوهشی در زمینهٔ باکتری‌های متحمل یا مقاوم به علف‌کش‌های یادشده انجام نشده است، در پژوهش حاضر به جداسازی و شناسایی جدایه‌های باکتریایی مقاوم و تعیین میزان تحمل آنها به سه علف‌کش اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر در خاک مزارع گندم پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

انتخاب علف‌کش‌های بررسی‌شده در پژوهش حاضر: به‌منظور بررسی باکتری‌های مقاوم یا متحمل به علف‌کش‌های محصول گندم، سه علف‌کش پرکاربرد مزارع گندم شامل آتلانتیس، اتللو و پوماسوپر پس‌از بررسی منابع و مشاهده‌های میدانی انتخاب شدند. نمونه‌برداری از خاک مزارع گندم تیمارشده با علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر طی تابستان ۹۷ از مزرعهٔ دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. نمونه‌برداری از لایهٔ سطحی خاک (عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متر) انجام شد. تعداد سه نمونه از هر کرت انتخاب و پس‌از مخلوط‌کردن آنها، یک نمونهٔ اصلی انتخاب (در مجموع، ۴۸ نمونهٔ ۱۰۰ گرمی) و پس‌از ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل شد.

تهیهٔ سری رقت از محلول خاک و کشت در محیط آگار غذایی حاوی ۱۰ درصد از علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر: روش طاهری[9] و همکاران (۲۰۱۷) با اندکی تغییر برای جداسازی اولیهٔ باکتری‌های خاک از محیط‌کشتی با غلظت ۱۰ درصد از سه علف‌کش آزمایش‌شده استفاده شد (۱۲). ابتدا محیط‌کشت آگار مغذی[10] تهیه و در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد استریل شد. هنگامی‌که دمای محیط به ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد رسید و پیش از اینکه منعقد شود، غلظت ۱۰ درصد از علف‌کش‌ها به هریک از پتری‌ها اضافه شد و پس‌از مخلوط‌کردن اولیهٔ محیط‌کشت و علف‌کش، محیط‌کشت‌ها در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌منظور تهیهٔ سری رقت، مقدار ۱ گرم از خاک آزمایش‌شده به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد؛ پس از مخلوط‌شدن، دوباره ۱ میلی‌لیتر از لولهٔ آزمایش اول به لولهٔ آزمایش دوم حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و با آن مخلوط شد؛ این کار تا لولهٔ ششم (10^{-6}) ادامه یافت و در انتها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده روی محیط‌کشت آگار مغذی حاوی غلظت ۱۰ درصد از هر علف‌کش قرار داده شد و با میلهٔ شیشه‌ای ال‌شکل روی سطح محیط آگار مغذی پخش شد. ظرف‌های پتری به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون جایگزینی منبع کربن با غلظت ۱۰ درصد علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر در محیط سوکسینات استاندارد[11]: به‌منظور انتخاب جدایه‌های باکتری‌های مقاوم یا متحمل به علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر، محیط‌کشت سوکسینات استاندارد حاوی ۱۰ درصد از علف‌کش‌های بررسی‌شده (تنها منبع کربن) بر اساس روش مجرد[12] و همکاران (۲۰۱۷) با اندکی تغییر استفاده شد. ابتدا کشت ۲۴ ساعته از جدایه‌های باکتری خالص‌شده تهیه و سپس سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی درون آب مقطر استریل تهیه شد. میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی

به‌طور جداگانه به ۴۸/۷۰ میلی‌لیتر محیط سوکسینیک‌اسید بدون منبع کربن و حاوی ۱۰ درصد از علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر اضافه شد و نمونه به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۶۰ دوردردقیقه هوادهی شد (اسیدیتهٔ محیط با NaOH یک مولار به ۷ رسید). در محیط‌کشت سوکسینات استاندارد اصلاح‌شده، میزان ۱۰۰ میلی‌لیتردرلیتر از علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر به‌جای سوکسینیک‌اسید اضافه شد (۱۳).

تعیین کمترین غلظت بازدارندگی (MIC[۱۳]) و کشندگی (MBC[۱۴]) علف‌کش‌های استفاده‌شده: کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی علف‌کش‌های استفاده‌شده در پژوهش حاضر به روش ریزلوله[۱۵] تعیین شد؛ در این روش، از غلظت ۳۰۰۰۰ تا ۱۴ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر تیمارها درون میکروپلیت (پلیت‌های الایزا) استفاده شد؛ درون هر چاهک میکروپلیت، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر محیط‌کشت آگار غذایی مایع[۱۶] استریل‌شده قرار داده شد. میزان ۱۵۰ میکرولیتر از هر تیمار علف‌کش با غلظت ۳۰۰۰۰ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر به چاهک اول هر ردیف اضافه شد و عمل مخلوط‌کردن چندین بار با سمپلر انجام شد. طبق روش رقیق‌سازی، میزان ۱۵۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و درون چاهک دوم ریخته شد و این عمل تا چاهک آخر هر ردیف ادامه یافت و در انتها، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از چاهک آخر خارج شد؛ در پایان، مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی بر میلی‌لیتر[۱۷] به هر چاهک اضافه شد. میکروپلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت درون شیکرانکوباتور با سرعت ۸۰ دوردردقیقه و دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند (۲). پس‌از پایان گرماگذاری، وجودداشتن یا نداشتن کدورت در چاهک به‌طور چشمی مشاهده و جذب نوری با دستگاه خوانشگر میکروپلیت[۱۸] در طول موج ۶۳۰ نانومتر بررسی شد. کمترین غلظت بازدارندگی، کمترین غلظتی در نظر گرفته شد که کدورتی در آن مشاهده نشد. کمترین رقتی که توانست ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها را از بین ببرد، کمترین غلظت کشندگی در نظر گرفته شد. مراحل آزمایش سه بار تکرار و نتایج به‌طور میانگین ارائه شدند (۱۴).

ش‌ناسایی جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی: آزمون‌هایی نظیر گرم با استفاده از KOH ۳ درصد، اکسیداز، کاتالاز، هوازی/بی‌هوازی، تولید گاز سولفیدهیدروژن (H_2S) از سیستئین، تولید لوان، هیدرولیز توئین، تولید رنگدانهٔ زانتومونادین، رنگ فلورسنت در محیط King-B بر اساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی انجام شدند (۱۵)؛ همچنین به‌منظور تشخیص دقیق برخی جدایه‌ها، روش توالی‌یابی ناحیه‌ای از ژن *16S rRNA* با استفاده از آغازگرهای 16sF (AGAGTTTGATCCTGGCTCAGTCG) و 16sR (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) با طول قطعهٔ تکثیری ۱۵۰۰ جفت باز استفاده شد (۱۶). یک لوپ از پرگنهٔ باکتری روی محیط‌کشت آگار مغذی برداشته و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد. استخراج DNA نمونه‌ها به روش جوشاندن[۱۹] انجام شد؛ به‌طوری‌که ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی آب جوش جوشانده و بی‌درنگ به‌مدت چند دقیقه روی یخ قرار داده شد؛ سپس نمونه‌ها به‌مدت ۳ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند و از فاز رویی برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد.. به‌منظور انجام آزمون یادشده، محلول پایهٔ ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش تهیه شد. تکثیر در دستگاه

ترموسایکلر با برنامهٔ حرارتی واسرشت‌سازی مقدماتی به‌مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه با واسرشت‌سازی به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، اتصال به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۶۲ درجهٔ سانتی‌گراد، سنتز به‌مدت ۴ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد و سنتز نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. مواد لازم برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (PCRbuffer (10X، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (2.5mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۲۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase (10U/ µl)، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت (10µM)، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت (10µM)، ۳ میکرولیتر DNA و ۱۵/۲۵ میکرولیتر آب استریل بود. به‌منظور اطمینان‌یافتن از درستی اندازهٔ قطعهٔ تکثیرشده، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. به‌منظور تعیین توالی این بخش از ژنوم، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل از جفت آغازگرهای استفاده‌شده به شرکت ماکروژن کرهٔ جنوبی ارسال شد. به‌منظور ترسیم درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن *16S rRNA* از روش اتصال مجاور[۲۰] و نرم‌افزار MEGA (نسخهٔ ۷) استفاده شد.

نتایج

درمجموع، تعداد ۲۱۰ جدایهٔ مختلف روی محیط جدید رشد کردند که ازنظر ویژگی‌های فنوتیپی شامل شکل کلنی، رنگ و دیگر ویژگی‌های ظاهری متفاوت بودند. رنگ‌های کلنی سفید، شیری، کرم، زرد و قرمز مشاهده شدند و اندازهٔ کلنی از ۱ تا ۵ میلی‌متر متغیر بود. در بین ۲۱۰ جدایهٔ مدنظر، انواع اشکال کلنی شامل محدب، تخت، با حاشیهٔ منظم و با حاشیهٔ غیرمنظم مشاهده شد. تولید لوان در برخی از کلنی‌ها مشهود بود. تعدادی از کلنی‌ها با تولید رنگدانه سبب تغییر رنگ محیط‌کشت شدند.

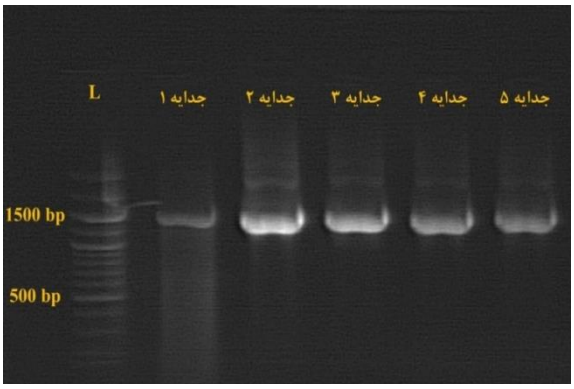
محیط‌کشت سوکسینات استاندارد حاوی غلظت ۱۰ درصد از علف‌کش‌های آزمایش‌شده برای انتخاب جدایه‌های باکتریایی مقاوم یا متحمل به علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر استفاده شد. نتایج نشان دادند از ۲۱۰ جدایهٔ به‌دست‌آمده در مرحلهٔ رقیق‌سازی اولیه، تعداد ۱۷ جدایه می‌توانند روی محیط‌کشت دارای غلظت ۱۰ درصد علف‌کش (تنها منبع کربن و نیتروژن) رشد کنند. جدایه‌های یادشده عموما کلنی‌های شیری، زرد و سفید داشتند و شکل کلنی آنها محدب تا تخت بود.

تعداد ۱۷ جدایه‌ای که قادر به استفاده از علف‌کش‌های آزمایش‌شده بودند، باتوجه‌به آزمون‌های گرم به روش KOH، تولید رنگ فلورسنت و رنگدانهٔ زانتومونادین، اکسیداز، کاتالاز، تولید گاز سولفیدهیدروژن (H_2S) از سیستئین، تولید لوان، هیدرولیز توئین ۲۰، رشد هوازی و بی‌هوازی در پنج گروه قرار گرفتند (جدول ۱)؛ در ادامه، یک جدایهٔ نماینده از هر گروه انتخاب و با روش مولکولی مبتنی بر توالی‌یابی بخشی از ناحیهٔ ژن *16S rRNA* به‌طور دقیق شناسایی شد. به‌منظور تأیید شناسایی جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های فنوتیپی، آغازگرهای رفت و برگشت عمومی 16sF و 16sR که بخشی از ناحیهٔ ژن *16S rRNA* تمام باکتری‌ها را تکثیر می‌کنند، در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شدند. همهٔ جدایه‌های آزمایش‌شده، یک قطعهٔ ۱۵۰۰ جفت بازی[۲۱] را تکثیر کردند که امکان مشاهدهٔ آن روی ژل آگارز ۱ درصد وجود داشت (شکل ۱). هیچ‌گونه قطعه‌ای در شاهد منفی تکثیر نشد و این امر درستی آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را تأیید کرد.

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های نمایندهٔ جداشده از خاک‌های مزارع گندم تیمارشده با علف‌کش

واکنش گرم	هوازی اجباری	بی‌هوازی اختیاری	اکسیداز	کاتالاز	تولید H_2S از سیستئین	لوان	هیدرولیز توئین ۲۰	تولید رنگ فلورسنت	تولید رنگدانهٔ زانتامونادین	جدایه‌های باکتریایی
−	+	−	−	+	+	−	+	−	−	*اسینتوباکتر*
−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	*سودوزانتوموناس*
−	−	−	−	+	−	+	+	−	−	*انسیفر ادهائرنس*
−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	*استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*
−	+	−	−	+	+	+	+	−	+	*زانتوموناس*

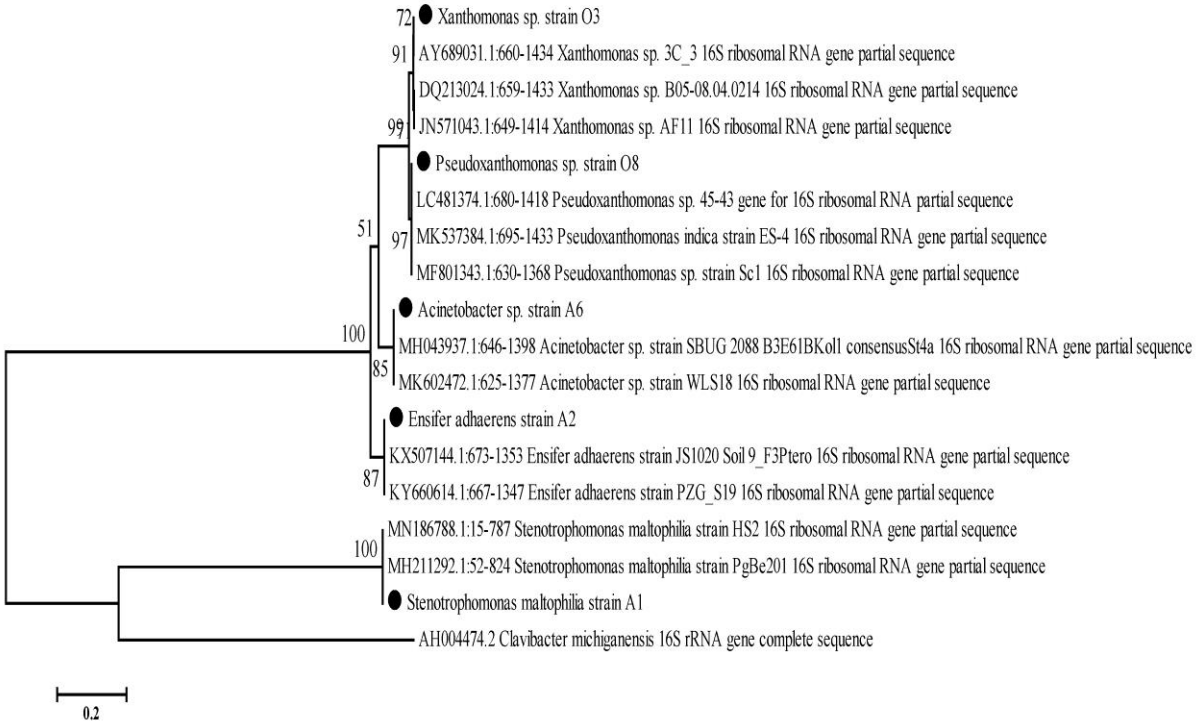
+، مثبت‌بودن و −، منفی‌بودن نتیجهٔ آزمون را نشان می‌دهد. به‌منظور اطمینان‌یافتن، آزمون‌ها دو بار تکرار شدند.



شکل ۱- تکثیر قطعهٔ ۱۵۰۰ جفت بازی بخشی از ژن *16S rRNA* در پنج جدایهٔ منتخب به‌دست‌آمده از خاک مزارع گندم تیمارشده با علف‌کش

پنج جدایهٔ نماینده که ازنظر ویژگی‌های فنوتیپی در گروه‌های جداگانه قرار داشتند، پس‌از تکثیر ژن *16S rRNA*، توالی‌یابی شدند. بلاست[۲۲] نتایج توالی‌یابی در بانک ژنی مرکز اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI)[۲۳] نشان داد جدایه‌های یادشده به چه گروه‌هایی تعلق دارند. علاوه‌بر جنس، گونهٔ دو جدایه نیز شناسایی شد و شباهت بیش از ۹۹ درصدی را با توالی‌های موجود در NCBI نشان داد؛ بنابراین، جنس و گونهٔ دو جدایه به‌ترتیب *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*[۲۴] و *انسیفر ادهائرنس*[۲۵] تشخیص داده شد. سایر جدایه‌ها به‌ترتیب به جنس‌های باکتریایی *زانتوموناس*[۲۶]، *سودوزانتوموناس*[۲۷] و *اسینتوباکتر*[۲۸] تعلق داشتند (شکل ۲).

کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) برای هریک از سه علف‌کش آزمایش‌شده به دست آمد. در زمینهٔ علف‌کش اتللو، کمترین MIC در جنس *زانتوموناس* (۰/۲۵) و کمترین MBC در دو جنس *اسینتوباکتر* و *زانتوموناس* (۰/۴) به دست آمد (جدول ۲). در زمینهٔ علف‌کش آتلانتیس، کمترین MIC و کمترین MBC به‌ترتیب برابر ۰/۳۵ و ۰/۵ در جنس *اسنیتوباکتر* به دست آمد (جدول ۳). در زمینهٔ علف‌کش پوماسوپر، کمترین MIC به جنس‌های *زانتوموناس* (۰/۳۲) و *سودوزانتوموناس* (۰/۴۵) تعلق داشت و کمترین MBC برای جنس *زانتوموناس* (۰/۵۳) به دست آمد (جدول ۴).



شکل ۲- درخت فیلوژنی رسم‌شده بر اساس توالی ناحیه‌ای از ژن *16S rRNA* جدایه‌های منتخب به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر و سایر جدایه‌های ثبت‌شده در NCBI به روش اتصال همسایه‌ها با نرم‌افزار MEGA 7؛ اعداد ثبت‌شده در محل انشعاب‌ها، درصد تأیید خوشه‌بندی با ۱۰۰۰ تکرار (Bootstrap) را نشان می‌دهند. خط نشانه برابر با ۰/۲ تغییر نوکلئوتید در هر محل است.

جدول ۲- کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی علف‌کش اتللو

جنس‌های باکتریایی	کمترین غلظت بازدارندگی (میلی‌لیتر علف‌کش در میلی‌لیتر محیط‌کشت)	کمترین غلظت کشندگی(میلی‌لیتر علف‌کش در میلی‌لیتر محیط‌کشت)
انسیفر ادهائرنس	۰/۴	۰/۶۵
استنوتروفوموناس مالتوفیلیا	۰/۳۵	۰/۵۵
زانتوموناس	۰/۲۵	۰/۴
سودوزانتوموناس	۰/۳۷	۰/۵۵
اسینتوباکتر	۰/۲۸	۰/۴

جدول ۳- کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی علف‌کش آتلانتیس

جنس‌های باکتریایی	کمترین غلظت بازدارندگی (میلی‌لیتر علف‌کش در میلی‌لیتر محیط‌کشت)	کمترین غلظت کشندگی(میلی‌لیتر علف‌کش در میلی‌لیتر محیط‌کشت)
انسیفر ادهائرنس	۰/۶	۰/۷
استنوتروفوموناس مالتوفیلیا	۰/۶	۰/۷۵
زانتوموناس	۰/۴۵	۰/۶
سودوزانتوموناس	۰/۵۰	۰/۷
اسینتوباکتر	۰/۳۵	۰/۵

جدول ۴- کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی علف‌کش پوماسوپر

کمترین غلظت کشندگی(میلی‌لیتر علف‌کش در میلی‌لیتر محیط کشت)	کمترین غلظت بازدارندگی (میلی‌لیتر علف‌کش در میلی‌لیتر محیط کشت)	جنس‌های باکتریایی
۰/۸	۰/۶۳	*انسیفر ادهائرنس*
۰/۷۵	۰/۵۵	*استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*
۰/۵۳	۰/۳۲	*زانتوموناس*
۰/۶۷	۰/۴۵	*سودوزانتوموناس*
۰/۷۳	۰/۵۲	*اسینتوباکتر*

بحث

استفادهٔ گسترده از علف‌کش‌ها در کشاورزی سبب ایجاد ریزموجودات مقاوم در برابر این مواد شیمیایی می‌شود. به‌طورکلی، حساسیت یا مقاومت به علف‌کش‌ها باتوجه‌به فعالیت‌های فیزیولوژیکی و ترکیب ژنتیکی ریزموجودات تعیین می‌شود (۱۷) که می‌تواند در آزمون‌های کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت کشندگی برای تعیین مقاومت و ماندگاری باکتری در غلظت‌های مختلف مواد شیمیایی و سموم کارایی داشته باشد (۱۸). در زمینهٔ باکتری‌های متحمل یا مقاوم به علف‌کش‌ها، پژوهشگران گزارش‌هایی در زمینهٔ توانایی طیف وسیعی از باکتری‌ها مانند جنس‌های *سودوموناس*، *رودوکوکوس*[۱]، *اسنیتوباکتر*، *میکروباکتریوم*[۱]، *باسیلوس*[۱]، *میکروکوکوس*[۱]، *دینوکوکوس*[۱] و *دلفتیا اسیدووورانس*[۱] و همچنین برخی از باکتری‌های شناخته‌شده مانند *اگروباکتریوم تومفسینس*[۱]، *کائلوباکتر کرسنتوس*[۱]، *سودوموناس پوتیدا*[۱]، گونه‌های *رایزوبیوم*[۱] و *ناکاردیا*[۱] در تجزیهٔ علف‌کش‌ها ارائه کرده‌اند (۱۹). در پژوهش‌های انجام‌شده، باکتری‌های *سودوموناس* به‌علت داشتن قابلیت تجزیهٔ آلاینده‌های آلی ازجمله مشتقات نفتی، هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک، علف‌کش‌ها و دیگر آلاینده‌ها، مدنظر پژوهشگران قرار گرفته‌اند. در پژوهش‌های انجام‌شده در زمینهٔ خانوادهٔ *سودوموناس*‌ها نشان داده شده است برخی از آنها می‌توانند علف‌کش‌های موجود را به‌شکل منابع غذایی برای تهیهٔ نیتروژن و کربن استفاده کنند؛ ازاین‌رو، آنها علف‌کش‌ها را به ترکیبات کوچک‌تری تجزیه می‌کنند که بی‌خطر یا کم‌خطرتر هستند.

بر اساس پژوهش‌های هاشمی[۲۹] و همکاران در سال ۲۰۱۵، دو جدایه از جدایه‌های جمع‌آوری‌شده برای تجزیهٔ علف‌کش پاراکوات با استفاده از روش شناسایی بر پایهٔ ژن *16s rDNA* به‌عنوان جنس‌های *استرپتومایسس*[۳۰] و *آکروموباکتر زایلوسوکسیدانس*[۳۱] شناسایی شدند. دو باکتری یادشده در نبود گلوکز، توان تجزیهٔ زیستی علف‌کش پاراکوات (حدود ۴۰ درصد) را داشتند و با افزودن گلوکز، این توانایی به‌طور چشمگیری افزایش (حدود ۷۰ درصد) یافت (۲۰). باتوجه‌به اینکه علف‌کش پاراکوات و علف‌کش‌های استفاده‌شده در پژوهش حاضر (اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر) از عناصر کربن و نیتروژن در ساختار شیمیایی خود بهره برده‌اند، باکتری‌ها با افزایش غلظت و پس‌از تطبیق با شرایط پیرامون گیاه، علف‌کش‌ها را به‌شکل منبع کربن و نیتروژن استفاده می‌کنند. در غلظت کم علف‌کش، باکتری‌های تجزیه‌کننده (عموما جنس *سودوموناس*) رشد معمولی خود را دارند و از عناصر

غذایی موجود در محیط‌کشت استفاده می‌کنند، اما در غلظت‌های زیاد علف‌کش که عناصر کربن و نیتروژن فراهم هستند، برخی از ژن‌های تجزیه‌کنندهٔ مواد شیمیایی مانند *AtzA* که در پلاسمید باکتری حضور دارند، شروع به بیان‌شدن می‌کنند و درنتیجه، تجزیهٔ علف‌کش به ترکیبات سازندهٔ آن تسریع می‌شود (۸). در پژوهش حاضر، باکتری *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* مقاوم یا متحمل به علف‌کش‌ها شناسایی شد. این ریزموجود در اکوسیستم‌های متنوعی ردیابی و به‌علت پویایی ژنوم باکتری، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در آن مشاهده شده است (۲۱). مطابق پژوهش‌های گذشته، تنوع زیست‌محیطی زیاد این ریزموجود سبب توسعهٔ توانایی آن برای استفاده از منابع غذایی مختلف ازجمله ترکیبات خطرناک مانند علف‌کش‌ها شده است؛ همچنین توانایی این باکتری در تجزیهٔ علف‌کش‌هایی مانند دیکامبا، آترازین و ددت[۳۲] گزارش شده است (۲۲). باکتری دیگری که در پژوهش حاضر به دست آمد، باکتری *انسیفر ادهائرنس* بود که از باکتری‌های ساکن خاک محسوب می‌شود. این باکتری دارای رابطهٔ همزیستی با ریشهٔ گیاهان است و به تثبیت نیتروژن می‌پردازد و از سوی دیگر، گیاه نیز عناصر غذایی و انرژی را برای باکتری فراهم می‌کند (۲۳). به نظر می‌رسد این باکتری توانایی استفاده از نیتروژن و کربن در غلظت‌های زیاد علف‌کش را دارد؛ به‌طوری‌که نیتروژن زیادی را استفاده و تثبیت می‌کند. باکتری‌های جنس *زانتوموناس* که جنس مهمی از باکتری‌های گرم منفی است، تنوع بیشتری نسبت به باکتری‌های مشابه دارند و تخصص میزبانی در آنها شکل گرفته است. اگرچه این باکتری کمتر از سایر باکتری‌های مطالعه‌شده طی پژوهش حاضر در خاک دیده می‌شود، این جنس توانایی نسبتا مطلوبی در استفاده از ترکیبات سه علف‌کش بررسی‌شده به‌شکل منابع غذایی دارد. باکتری *سودوزانتوموناس*، ریزموجودی است که در بسیاری از محیط‌ها مانند فیلترهای زیستی و پساب‌های صنعتی، خاک‌های زراعی، خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای یا روغن‌ها، چشمه‌های آب گرم و بافت گیاهی یافت می‌شود و همانند دیگر باکتری‌های متنوع ازنظر زیست‌محیطی، ژنوم آن نیز برای استفاده از منابع گوناگون کربن و نیتروژن توسعه یافته است و این باکتری را قادر می‌کند تا به‌آسانی در محیط‌های دارای شرایط نامساعد محیطی به رشد خود ادامه دهد؛ ازاین‌رو، رشد باکتری یادشده در خاک‌های زارعی که غلظت‌های زیادی از علف‌کش در آنها استفاده شده است، دور از انتظار نیست. آخرین جنس باکتریایی که در پژوهش حاضر شناسایی و بررسی شد، *اسینتوباکتر* بود. این باکتری قدرت تخمیر قندها را ندارد و گونه‌های مختلف آن از باکتری‌های مهم خاک و آب به شمار می‌آیند. پژوهش‌های گذشته در زمینهٔ این باکتری نشان داده‌اند قادر به استفاده از منابع کربن به‌شکل ساده است و ازاین‌رو می‌تواند طیف وسیعی از منابع را استفاده کند (۲۴).

نتیجه‌گیری

یکی از مباحثی که به‌تازگی در زمینهٔ تحمل به علف‌کش‌ها مطرح شده است، استفاده از ژن‌های مقاومت در باکتری‌ها و انتقال آنها به گیاه میزبان است؛ بنابراین شناسایی باکتری‌های مقاوم و متحمل در برابر علف‌کش‌ها، گامی ضروری به نظر می‌رسد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، باکتری‌های *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا*، *انسیفر ادهائرنس*، *سودوزانتوموناس*،

زانتوموناس و *اسینتوباکتر*، باکتری‌های مقاوم یا متحمل به علف‌کش‌های اتللو، آتلانتیس و پوماسوپر در مزارع گندم هستند. ریزموجودات دارای توان تحمل یا مقاومت بیشتر در برابر علف‌کش‌ها، تجزیه‌کنندگان متداول این مواد محسوب می‌شوند؛ بنابراین، بررسی میزان تجزیه‌کنندگی این باکتری‌ها طی مطالعه‌های بعدی پیشنهاد می‌شود.

References

(1) Deghan Benadaki M. *Weed management in wheat fields*. 1st ed. Tehran: Institute for Applied Higher Education, Academic Jihad; 2018.

(2) Deihimfard R., Zand E., Damghani AM., Soufizadeh S. Herbicide risk assessment during the wheat self-sufficiency project in Iran. *Pest Management Science* 2007; 63(10): 1036-1045.

(3) Kudsk P. Optimising herbicide dose: A straightforward approach to reduce the risk of side effects of herbicides. *Environmentalist* 2008; 28(1): 49-55.

(4) Izadi A. Evaluation of atrazine shelf life in greenhouse and field conditions and its effect on soil microbial activity and agroforestry [Dissertation]. Mshhad: Ferdowsi University of Mashhad; 2009.

(5) Zhang Q., Xu F., Lambert KN., Riechers DE. Safeness coordinately induce the expression of multiple proteins and MRP transcripts involved in herbicide metabolism and detoxification in *Triticum tauschii* seedling tissues. *Proteomics* 2007; 7(8): 1261-1278.

(6) Rousseaux S., Hartmann A., Lagacherie B., Piutti S., Andreux F., Soulas G. Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: Effects of different inoculum densities. *Chemosphere* 2003; 51(7): 569-576.

(7) Nazarian A., Mousawi MA. Study of bacterial resistance to organophosphorus pesticides in Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 2005; 2(3): 207-211.

(8) Rezaei D., Haghnia GH., Laksian A., Hassanzadeh Khayat M., Nasirli H. Study of atrazine biodegradation by *Pseudomonas fluorescence* and *Pseudomonas aeruginosa* (*In Vitro*). *Journal of Soil and Water Conservation* 2011; 25(4): 799-806 (in Persian).

(9) Behki RM., Khan SU. Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1986; 34(4): 746-749.

(10) Mandelbaum RT., Allan DL., Wackett LP. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; 61(4): 1451-1457.

(11) Ebadati A., Gholamalipour Alamdari E., Avasaji Z., Rahemi Karizaki A. Effect of application time of dual purpose herbicides and mixing herbicides on weeds control and wheat yield. *Journal of Plant Ecophysiology* 2020; 11: 192-209.

(12) Taheri Z., Ghasemian Roodsari F., Afshari MP. Isolation and characterization of herbicide-degrading bacteria metibosin in contaminated soils under cultivation in Zanjan province. *Journal of Agriculture Biotechnology* 2017; 16(1): 11-18 (in Persian).

(13) Mojarad M., Alamzad A., Qureishi G., Javaheri M. Evaluation of growth and decomposition potential of kerosene by several bacteria isolated from soil and water contaminated with petroleum compounds. *Environment and Natural Resources Journal* 2017; 70(1): 161-172 (in Persian).

(14) Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 94(3): 223-253.

(15) Schaad NW., Jones JB., Chun W. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd edit. New York: American Phytopathology Society Press; 2001.

(16) Weisburg WG., Barns SM., Pelletier DA., Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Bacteriology Research* 1991; 173(2): 697-703.

(17) Karishma B., Prasad SH. Isolation, characterization and growth studies of malathion insecticide degrading bacteria. *International Journal of Environmental Science* 2016; 6(5): 697-706.

(18) Wesgate R., Grasha P., Maillard JY. Use of a predictive protocol to measure the antimicrobial resistance risks associated with biocidal product usage. *American Journal of Infection Control* 2016; 44: 458-464

(19) Sene L., Converti A., Secchi GA., Simão RD. New aspects on atrazine biodegradation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2010; 53(2): 487-496.

(20) Hashemi SH., Ali Asgharzad N., Khvarvar R., Avestan SH. Isolation and characterization of Paraquat herbicides from Tabriz soil. *Journal of Soil Biology* 2015; 2(3): 117-128 (in Persian).

(21) Aeini M., Khodakaramian G. Rhizosphere bacterial composition of the sugar beet using SDS-PAGE methodology. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2017; 60: e17160374.

(22) Murray PR., Rosenthal KS., Pfaller MA. *Medical Microbiology, with Student Consult Online Access, Medical Microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Mosby; 2013.

(23) Wendt T., Doohan F., Mullins E. Production of *Phytophthora infestans*-resistant potato (*Solanum tuberosum*) utilising *Ensifer adhaerens* OV14. *Transgenic Research* 2012; 21(3): 567-578.

(24) Desouky A. *Acinetobacter* environmental and biotechnological application. *African Journal of Biotechnology* 2003; 2: 71-74.

---

[1]- Bioremediation
[2]- Rezaei
[3]- *Pseudomonas fluorescens*
[4]- *Pseudomonas aeruginosa*
[5]- Behki
[6]- Khan
[7]- *Pseudomonas*
[8]- Mandelbaum
[9]- Taheri
[10]- Nutrient Agar
[11]- Standard Succinate Medium
[12]- Mojarad
[13]- Minimum Inhibitory Concentration
[14]- Minimum Bactericidal Concentration
[15]- Microdilution
[16]- Nutrient broth
[17]- CFU/mL
[18]- Microplate – Reader
[19]- Oiling
[20]- Neighbor joining
[21]- Base pair
[22]- Basic Local Alignment Search Tool
[23]- National Center for Biotechnology Information
[24]- *Stenotrophomonas maltophilia*
[25]- *Ensifer adhaerens*
[26]- *Xanthomonas*
[27]- *Pseudoxanthomonas*
[28]- *Acinetobacter*
[29]- Hashemi
[30]- *Streptomyces* sp
[31]- *Achromobacter xylosoxidans*
[32]- DTT