

تجزیه‌ی حشره کش دیمتوات توسط باکتری *Pseudomonas Putida*

دکتر ابوالفضل نظریان^۱

تاریخ دریافت ۸۸/۲/۱ تاریخ پذیرش ۸۸/۴/۱۷

چکیده

پیش زمینه و هدف: دیمتوات^۲ به‌عنوان ترکیب آلی فسفردار در مبارزه با آفات کشاورزی استفاده می‌شود که برای اعصاب انسان سمی است. پسودوموناس‌های حاوی پلاسمیدهای تجزیه کننده ترکیبات فسفردار، راهی مناسب برای پاکسازی محیط زیست معرفی شده‌اند. **مواد و روش کار:** پسودوموناس پیوتیدا از خاک آلوده به این سموم تفکیک و در محلول معدنی غنی شده با دیمتوات، شناسایی و به‌طور مطلوبی کشت شد. مصرف دیمتوات براساس مهار (سمیت) استیل کولین استراز بدست آمد. پلاسمیدهای تجزیه کننده آنزیم‌های هیدرولیتیک به‌وسیله آکریدین اورنج حذف شدند و از باکتری مقاوم به حساس منتقل شدند.

یافته‌ها: دیمتوات با غلظت ۰/۸ گرم در لیتر در محلول معدنی به‌وسیله باکتری به‌خوبی مصرف شد. رشد باکتری در محیط حاوی دیمتوات دو برابر بیشتر از فسفات معدنی بود. میزان پروتئین تام تولیدی تا ۳۵۷ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت. فعالیت آنزیم استیل کولین استراز توسط دیمتوات در غلظت‌های ۰/۲ تا ۲ گرم در لیتر به‌طور خطی کاهش می‌یافت اما چنانچه پسودوموناس پیوتیدا در محلولی دارای دیمتوات با غلظت دو گرم در لیتر به‌مدت ۴۸-۹۶ ساعت کشت می‌شد اثر مهارکنندگی باقیمانده دیمتوات در آن محلول به‌ترتیب ۶۳ تا ۹۷ درصد کاهش می‌یافت. این باکتری مقاوم برابر دیمتوات در اثر آکریدین اورنج، پلاسمیدهای مقاومت را از دست می‌داد. پلاسمیدهای مقاومت به باکتری‌های حساس، انتقال یافتند.

بحث و نتیجه‌گیری: پلاسمیدهای مذکور که آنزیم‌های تجزیه کننده سموم فسفردار را بیان می‌کنند، ابزار موثری برای پاکسازی ترکیبات آلی فسفردار (سموم ضد اعصاب) محسوب می‌شوند و با فن آوری‌های نوین امکان کاربرد در جلوگیری از مضرات ناخواسته ترکیبات آلی فسفردار را دارند.

کلید واژه‌ها: تجزیه بیولوژیکی، دیمتوات، مصرف ارگانوفسفات، ضد استیل کولین استراز

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیستم، شماره سوم، ص ۲۲۱-۲۱۵، پاییز ۱۳۸۸

آدرس مکاتبه: زنجان، شهرک کارمندان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، تلفن: ۰۲۴۱۴۲۴۰۳۰۰-۱

Email: nazarian@zums.ac.ir

مقدمه

سموم فسفردار پرمصرف در کشاورزی و بسیار سمی است (۴) و ممکن است ترانوژن یا سرطان‌زا باشد (۵). برخی باکتری‌های مقاوم به دیمتوات، تفکیک و شناسایی شده (۶)، تجزیه میکروبی دیمتوات (۷) و باکتری‌های مقاوم به دیمتوات در آبیان گزارش شده‌اند (۸،۹). باکتری‌های مقاومی که جدا شده‌اند دارای پلاسمیدهای تجزیه کننده ترکیبات آلی فسفردار بوده‌اند (۱۰). هدف از این پژوهش یافتن باکتری‌های توانا در برابر سموم ضد اعصاب (دیمتوات) است. براساس مطالعات این نوع از باکتری‌ها، حاوی پلاسمیدهای تولید کننده آنزیم‌های هیدرولیتیک و مصرف

ترکیبات آلی فسفردار از آفت‌کش‌های پر مصرف‌اند که ۳۴ درصد از خریدهای حشره‌کش‌ها را در جهان به‌خود اختصاص می‌دهند (۱). اکوسیستم‌های طبیعی به‌طور گسترده‌ای به‌وسیله ارگانوفسفات‌ها آلوده شده‌اند. سمیت آن‌ها در محیط زیست قابل توجه است و کاربرد روش‌های مناسب به‌منظور پاک‌سازی محیط زیست از این سموم ضروری است. تجزیه بیولوژیکی، روش موثری برای سم زدایی در محیط‌های طبیعی آلوده به ترکیبات آلی فسفردار و باقیمانده‌های سمی آن‌ها است (۲،۳). دیمتوات یکی از انواع

^۱استادیار بخش بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، زنجان، ایران
^۲Dimethoate

محیط‌های کشت جامد با شمارش کلنی در هر ۲۴ ساعت کنترل شدند. مقدار فسفات تام و معدنی (۹) و پروتئین‌های خارج سلولی و درون سلولی پس از سانتریفوژ نمودن در (MSE 25Beckman, Fixed angle) ۲۰۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه و اولتراسون (MSE-150W) با قدرت ۷۰ درصد و پروب ۲۲/۵ تعیین شد. معرف‌های اندازه‌گیری فسفات شامل: آسکوربات ۱۰ درصد، مولیبدات آمونیوم ۴۲ درصد در اسیدسولفوریک به نسبت ۱:۶ با نیترات منیزیم ۱۰ درصد در اتانل خالص و اسید کلریدریک ۴ درصد مخلوط شدند.

البته کلیه‌ی ظروف شیشه‌ای برای پاک شدن از فسفات‌ها یک شب در اسید نیتریک پنج نرمال نگهداشته و با آب دو بار تقطیر شستشو داده شدند (تمام مواد مصرفی از شرکت Merck تهیه شدند).

تجزیه باکتریولوژیکی دیمتوات: چهار باکتری مقاوم: spp *P.putida*, *P. fluorescence*, *F. breve*, *Flavobacterium* خالص یا مخلوط با دیگر باکتری‌ها با کشت در محلول معدنی و مصرف دیمتوات (دو گرم در لیتر) مقایسه شدند. اثر باقیمانده سم بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز با کاربرد (روش Ellman, ۱۱) با استفاده از اسپکتروفوتومتر (PerkinElmer35) در مقایسه با محلول‌های معدنی فاقد کشت باکتری (کنترل) که حاوی دیمتوات با غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱/۰، ۱/۲، ۱/۴ و ۲/۰ گرم در لیتر) تعیین شد.

حذف و انتقال پلاسمیدها: باکتری *P. Putida* که احتمالاً حاوی پلاسمیدهای مخصوص تجزیه کننده و یا مصرف کننده دیمتوات مطرح شده بود، در محیط معدنی با افزودن آکریدین اورنج با غلظت ۰/۳ گرم در لیتر در حالت هوازی با دمای ۳۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد، در این شرایط باکتری‌هایی که این پلاسمیدها (عوامل مقاومت) را از دست دادند با روش کپی‌گذاری کلنی‌های حساس در محیط‌های نیمه جامد حاوی دیمتوات و فاقد دیمتوات تفکیک شدند. در باکتری‌های مذکور علاوه بر توانایی مصرف دیمتوات، مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها مانند استرپتومایسین و نالیدیکسیک اسید هم وجود داشت که از آزمایش‌های تعیین مقاومت در برابر گروهی از آنتی بیوتیک‌ها انتخاب شدند. باکتری *P* که توانایی آن در مصرف دیمتوات به اثبات رسیده بود به همراه باکتری حساس (با عدم توانایی مصرف دیمتوات)، که مقاوم به دو آنتی بیوتیک فوق بود، ابتدا در محلول معدنی حاوی ۰/۲ گرم در لیتر دیمتوات، به مدت ۴۸ ساعت در حالت هوازی و دمای ۳۰ درجه کشت داده شدند، سپس از کشت مناسب با کدورت رشد مناسب در رقت 10^{-3} در محیط نیمه جامد حاوی ۲ گرم در لیتر دیمتوات و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

کننده است که امید می‌رود با کمک فن آوری‌های نوین، کاربردهای موثری در مقابله با مضرات ناخواسته سموم و ترکیبات آلی فسفردار ارائه شود.

مواد و روش کار

مصرف دیمتوات به عنوان منبع فسفر و انرژی توسط باکتری‌های گرم منفی مطالعه شد و از آنزیم استیل کولین استراز در تایید کاهش مهارکنندگی دیمتوات پس از مصرف آن استفاده شد. چون سمیت دیمتوات به عنوان مولکول آلی فسفردار با مهار کردن آنزیم مذکور در پایانه‌های عصبی و عضلاتی انسان و جانداران در محیط زیست بروز می‌نمود (۱۱). باکتری مورد مطالعه از میان انواع مقاوم به ترکیبات آلی فسفردار و از نمونه‌های خاک یک منطقه آلوده به این سموم انتخاب شده بود. باکتری‌هایی که پایداری، رشد و مقاومت مطلوبی در شرایط مختلف از لحاظ دما، pH، غلظت سم در یک محیط معدنی نشان می‌دادند، جدا شدند و سپس با روش‌های متداول و نیز مجموعه (Rosch) API 20E، شناسایی شدند که از دو خانواده پseudomonas و فلواباکتریوم بودند، (۱) که از میان آن‌ها دو باکتری *P. putida* (P) و *F. breve* (F) انتخاب شدند.

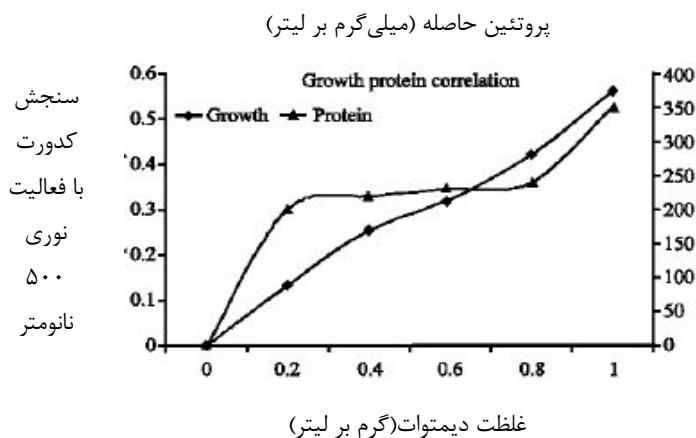
تلقیح دو باکتری مقاوم (P و F) به ترتیب در ۱۶ فلاسک حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محلول معدنی استریل (هیدروکسی متیل آمینو متان یا تریس (Base) ۵۰mM، کلرور پتاسیم ۲۰۷mM، سولفات منیزیم ۰/۸mM، کلرور آمونیوم ۴۰mM، کلرور فریک ۰/۰۵ mM (همه املاح از شرکت Merck) در آب مقطر تا حجم یک لیتر و pH=۷/۲-۷/۴ در دو تکرار تهیه شد. این محلول به وسیله گلوکز و یکی از سموم فسفردار (Guthion ۰/۱ گرم در لیتر و Dimethoate ۰/۲ گرم در لیتر به دو صورت هیدرولیز شده و دست نخورده) غنی شد و دو فلاسک کنترل فاقد گلوکز بودند. تمام فلاسک‌ها در حالت هوازی با تکان ۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۰ درجه تا ۴۸ ساعت کشت شدند. رشد باکتری‌ها با کدورت محلول‌های کشت در طول موج ۵۰۰ نانومتر تعیین شد و در محیط معدنی نیمه جامد حاوی دیمتوات برای تشکیل کلنی با تعداد 10^5 سلول کشت شدند (از رقت‌های سریال محلول‌های کشت باکتری در محیط نیمه جامد پس از ۴۸ ساعت کلنی‌ها شمارش شدند).

مصرف مواد آلی فسفردار: چهار سویه مقاوم (*P. putida*, *P. fluorescence*, *F. breve*, *Flavobacterium* spp.) به صورت خالص و یا مخلوط در ۷۵ میلی‌لیتر محلول معدنی حاوی صفر و دو گرم در لیتر دیمتوات یا اورتو فسفات جداگانه در دو تکرار در شرایط هوازی و دمای ۳۰ درجه تا ۴۸ ساعت کشت داده شدند. محیط‌های کشت مایع با بررسی ایجاد کدورت رشد و

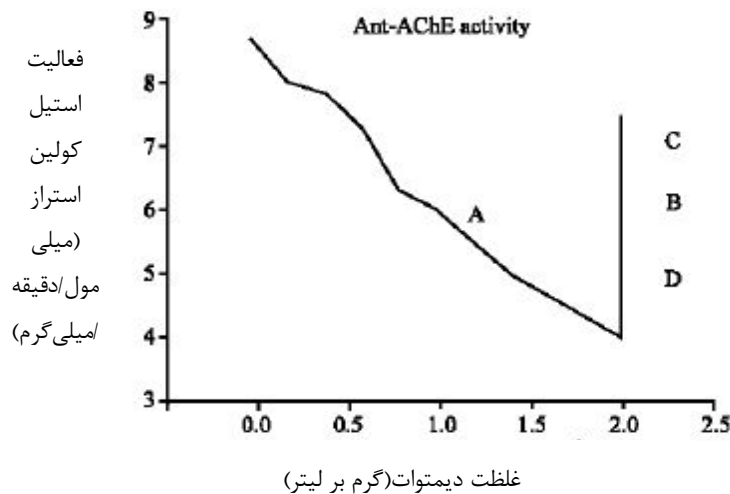
و با روش کپی برداری در محیط نیمه جامد حاوی دیمتوات رشد نکرد. اما دارای عوامل مقاومت نسبت به استرپتومیسین و نالیدیسیک اسید بود. پس از کشت توام دو گونه از باکتری مقاوم و باکتری حساس، باکتری حساس که پلاسمیدهای تجزیه کننده دیمتوات را دریافت نموده بود و همچنین عوامل

جدول شماره (۱): مصرف دیمتوات، دیمتوات به عنوان فسفات آلی در مقایسه با فسفات معدنی ترجیحاً به عنوان تنها منبع فسفر و انرژی برای تولید ماده مهم مانند پروتئین و دیگر نیازهای متابولیکی باکتری مصرف شده که رابطه بین فسفات مصرفی و پروتئین تولیدی در بین چهار باکتری مقایسه شده است. نتیجه کشت خالص بهتر از کشت مخلوط می باشد.

درصد نسبت پروتئین به فسفات	مواد مصرفی		فسفات معدنی μM		فسفات آلی μM		فسفات ها	نام باکتری
	پروتئین mg/ml	فسفات μM	۹۶ (hr)	۰ (hr)	۹۶ (hr)	۰ (hr)		
۷۰/۰۸۴ ۶۳/۲۹	۳۵۷ ۳۵۵	۳/۶۶۷ ۵/۶۰۹	۰/۰۰۸ ۱/۴	۰/۰۵۰ ۷/۰۰۹	۴/۰ -	۷/۶۲۵ -	دیمتوات فسفات	P.Putida
۷۴/۱۰ ۴۷/۹۳	۲۸۷ ۲۶۷	۳/۸۷۳ ۵/۵۸	- ۱/۴۳۹	۰/۰۵۰ ۷/۰۰۹	۳/۸۰۲ -	۷/۶۲۵ -	دیمتوات فسفات	P.Flourescence
۲۹/۱۶ ۱۰/۰۶	۱۱۳ ۸۳	۳/۸۷۵ ۵/۵۰۸	- ۱/۵	۰/۰۵۰ ۷/۰۰۹	۳/۸۰ -	۷/۶۲۵ -	دیمتوات فسفات	F.Spp
۹۳/۵۴ ۴۶/۴۱	۱۵۸ ۲۶۵	۳/۹۹۵ ۵/۷۰۹	- ۱/۵	۰/۰۵۰ ۷/۰۰۹	۳/۶۸۰ -	۷/۶۲۵ -	دیمتوات فسفات	F.Breve
۳۷/۸۷ ۴۱/۴۹	۱۵۴ ۲۳۸	۴/۰۶۵ ۵/۶۳۹	- ۱/۴۷	۰/۰۵۰ ۷/۰۰۹	۳/۶۸۰ -	۷/۶۲۵ -	دیمتوات فسفات	کشت مخلوط چهار باکتری



نمودار شماره (۲): همبستگی رشد - سنتز پروتئین، پseudomonas بیوتیدا کدورت رشد خطی در برابر غلظت های مختلف دیمتوات (صفر، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۶، ۰/۰۸، ۱/۰ گرم بر لیتر) و فسفات معدنی (۱/۰ گرم بر لیتر) و پروتئین تام نشان داد.



نمودار شماره (۳): مهار آنزیم استیل کولین استراز (AChE)، دیمتوات در غلظت‌های مختلف (۰/۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۰، ۱/۴ و ۲/۰) فعالیت آنزیم استیل کولین استراز را مهار کرده (A) اما در محیط کشت دارای دیمتوات (۲/۰ گرم بر لیتر) باکتری مقاوم (پ پیوتیدا) به علت مصرف دیمتوات در طی ۴۸ و ۹۶ ساعت (B,C) در حالت خالص یا (D) در حالت مخلوط با دیگر باکتری‌ها، از مهار آنزیم مذکور به ترتیب ۶۳ درصد تا ۹۷ درصد کاسته است.

انرژی و چرخه‌های بیوسنتز مثل پروتئین می‌باشد. باکتری‌های مقاوم که به دیمتوات سازش یافته‌اند به اندازه دو برابر بیش از فسفات معدنی فعالیت حیاتی نشان دادند. برای اثبات علت توانایی باکتری‌های مقاوم در یک محیط معدنی که فاقد ماده مغذی دیگری است، این عوامل مقاومت یا در واقع پلاسمیدها ابتدا توسط آکریدین اورنج حذف شدند و باکتری توانایی مذکور را از دست داد. از طرف دیگر با انتقال پلاسمیدهای مقاوم به باکتری‌های حساس، رشد و مقاومت در برابر ترکیبات آلی فسفردار در این باکتری‌ها مشاهده شد. چون سمیت اصلی دیمتوات مهار کردن فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) بود، میزان مصرف ترکیبات آلی فسفردار با اندازه گیری فعالیت AChE انجام شد. مهار خطی AChE توسط دیمتوات و تاثیر افزایش یافته این فعالیت پس از رشد مطلوب P. Putida در کشت باکتری به صورت خالص، نمایانگر مصرف دیمتوات و کاهش سمیت آن می‌باشد. با این مطالعه امکان کاربرد باکتری‌های وحشی که حاوی پلاسمیدهای تجزیه کننده ترکیبات آلی فسفردار نظیر دیمتوات هستند، اثبات می‌شود و می‌توانند ابزارهای تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک ویژه بر علیه ترکیبات و عوامل ضد عصب باشند.

کاربردهای زیستی که بالقوه در اکوسیستم طبیعی وجود دارند (۱۶-۲) همواره نظر پژوهشگران را جلب ساخته به طوری که

بحث

P. Putida و F. breve در زمره باکتری‌های مقاوم با توانایی‌های متعدد برای تجزیه باکتریولوژیکی سه گروه از ترکیبات آلی فسفردار شناسایی شده بود و نیز برای مصرف ترکیبات آلی فسفردار مذکور استفاده شد (۱)، اگرچه در مطالعات مشابه فسفو - دی استراز برای سم زدایی آفت کش‌های فسفو-تری استر بکار رفته است (۲)، باکتری‌های مستعد با دارا بودن چرخه کاتابولیکی مرتبط به این روند کشیده می‌شوند تا به عنوان تنها منبع فسفر از آن‌ها استفاده کنند (۳، ۱۲). مقاومت به ترکیبات آلی فسفردار ناشی از وجود پلاسمیدهای تجزیه کننده، باکتری را برای ساختن آنزیم‌های کاتالیتیکی و مصرف کننده ترکیبات آلی فسفردار مستعد نموده تا بعنوان تنها منبع فسفر، انرژی و احتمالاً ماده اولیه برای بیوسنتز پروتئین‌ها و دیگر مواد عمل کند (۱۳، ۱۶). P. Putida F₁ ترکیبات آروماتیک مختلف را از طریق چرخه‌های مرتبط در مطالعه‌های مشابه (۱۴) مصرف کرده است. P. Putida F₁ به مصرف مواد جدید عادت کرده و مکانیزم مولکولی به این عادت با طیف گسترده‌ای از مواد حلقوی معین شده است (۱۵، ۱۴). گونه‌های مذکور توسط مواد جدید تر القاء شده و نوع وحشی (تغییر نیافته) از باکتری توان کم‌تر به این مواد داشته است، نتایج مذکور توان P. Putida را به مصرف مواد مختلف نشان داده است (۱۵). مصرف ترکیبات آلی فسفردار به عنوان ماده پایه،

گسترده‌گی آثار عوامل گوناگون در یک اکوسیستم، به‌سادگی قابل پیش بینی نبوده و نیازمند مطالعات گروهی طولانی مدت می‌باشد تا در مراحل اجرایی موفقیت‌هایی کسب نماید.

تشکر

این پژوهش با پشتیبانی وزارت دفاع و مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک (IBB) دانشگاه تهران صورت گرفته که بدین وسیله کمال امتنان را دارم.

مطالعات گسترده‌ای در زمینه باکتری‌های مفید که دارای توانایی‌های مولکولی و تولید کاتالیست‌های زیستی‌اند (۱۳، ۱۴، ۱۵) بکار برده‌اند. سرعت، ویژگی و سالم بودن آنزیم‌های هیدرولیتیک با کمک فن آوری‌های نوین میزان موفقیت را افزایش داده است. پژوهشگران با مطالعات مولکولی باکتری‌های مشابهی را برای اثبات پلاسمیدهای تجزیه کننده دیمتوات از منابع زیستی تفکیک و بررسی نموده‌اند (۱۰-۷).

محدودیت‌های مطالعه: این مطالعه مدلی از امکان کاربرد اندکی از توانایی‌های میکروارگانیسم‌ها در پاکسازی آلودگی‌های شیمیایی یک اکوسیستم طبیعی است. بدیهی است که تنوع زیستی و

References:

- Nazarian A, Mousawi MA. Study of bacterial resistance to organophosphorus pesticides in Iran. *Iran J Environ Health Sci Eng* 2005; 2(3):207-11.
- Zhang JL, Qiao CL. Novel approaches for remediation of pesticide pollutants. *Int J Environ Pollut* 2002; 18(5):423-33
- Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS* 2006; 30(3): 428-78.
- Zhang RZ, Jiang Cui J, He J, GU X, Li S. Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes. *Can J Microbiol* 2005; 51(4):337-43.
- Al-Jughbir MT, Salhab AF, Hamarsheh FA. Dermal and inhalation exposure to dimethoate. *Arch Environ Contam Toxicol* 1992; 22(4):358-61.
- Racke KD, Coats JR. Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: specificity of enhanced microbial degradation. *J Agric Food Chem* 1988; 6:193-9.
- Mandal Deb, Mandal M, Pal SNK. Plasmid – mediated dimethoate degradation by bacillus lichenifor isolated from fresh water fish *Lebeo rohita*. *J Biomed Biotechnol* 2005; 3: 280-6.
- Mandal Deb, Mandal MS, Pal NK. Screening of dimethoate resistance among bacterial isolates from the Gam river water at Howrah and Hooghly districts. *Indian Environ Ecol* 2003; 21: 204-6
- Mandal Deb, Mandal MS, Pal NK. Evaluation of bioremediation potential of organophosphorus pesticides dimethoate, 30% EC by heavy metal and antibiotic resistant p vulgaris isolated from ganges at sreerampore. *Indian Res J Chem Environ* 2002; 6:49-52
- Deshpande NM, Dhakephalkar PK, Kanekar PP. Plasmid-mediated dimethoate degradation in *Pseudomonas aeruginosa* MCMB-427. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33: 275-9
- Ellman E. Acetylcholine esterase assay method. *Biochem. Pharmacology* 1961; 7:88
- Foster LJR, Kewan BH, Vancov T. Microbial degradation of the organophosphate pesticide, Ethion. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 240: 49-53
- Rauschel FM. Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5(3):288-95.
- Choi E. Expansion of growth substrate range in *Pseudomonas Putida* F1 by mutations in both *cymR* and *todS*. *Microbiology* 2003; 149: 795-805.
- Bertani I, Kojic M, Venturi V. Regulation of the p-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (*pobA*)

in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida*
WCS358. *Microbiology* 2001; 147:1611-20.

16. Digrak M, Kazanici F. Effect of some
organophosphorus insecticides on soil
microorganisms. *Turk J Biol* 2001; 25:51-8